

554026

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局(43)国際公開日  
2004年11月4日 (04.11.2004)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 2004/093900 A1(51)国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 38/17, 48/00, A61P 35/00 [JP/JP]; 〒2600034 千葉県千葉市中央区汐見が丘7-15 Chiba (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP2004/004516

(74)代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo (JP).

(22)国際出願日: 2004年3月30日 (30.03.2004)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:  
特願2003-116299 2003年4月21日 (21.04.2003) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).

(72)発明者; および  
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 島田英昭 (SHIMADA, Hideaki) [JP/JP]; 〒2720812 千葉県市川市若宮1-13-6 Chiba (JP). 松下一之 (MATSUSHITA, Kazuyuki) [JP/JP]; 〒2600851 千葉県千葉市中央区矢作町540-36 Chiba (JP). 朝長毅 (TOMONAGA, Takeshi) [JP/JP]; 〒2600851 千葉県千葉市中央区矢作町540-69 Chiba (JP). 野村文夫 (NOMURA, Fumio) [JP/JP]; 〒2640033 千葉県千葉市若葉区都賀の台1-20-11 Chiba (JP). 落合武徳 (OCHIAI, Takenori)

(81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84)指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

A1

(54) Title: APOPTOSIS INDUCING AGENT AND METHOD OF INDUCING APOPTOSIS

WO 2004/093900

(54)発明の名称: アポトーシス誘導剤及びアポトーシス誘導方法

(57)Abstract: It is intended to provide a novel means of stably and surely inducing cell apoptosis targeting c-myc gene. An apoptosis inducing agent containing as the active ingredient a protein interacting with an FBP protein or a polynucleotide encoding this protein; and a method of inducing apoptosis characterized by involving the step of bringing the above apoptosis inducing agent into contact with a cell.

(57)要約: 本発明は、c-myc遺伝子を標的として、細胞アポトーシスを安定かつ確実に誘導するための新しい手段を提供することを目的とする。本発明は、FBPタンパク質と相互作用するタンパク質、又はこのタンパク質をコードするポリヌクレオチドを有効成分とする含有するアポトーシス誘導剤、ならびに該アポトーシス誘導剤を細胞に接触させる工程を含むことを特徴とするアポトーシス誘導方法である。

## 明 細 書

### アポトーシス誘導剤及びアポトーシス誘導方法

#### 技術分野

本発明は、アポトーシス誘導剤及びアポトーシス誘導方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、その存在が宿主動物にとって有害となるような細胞（例えば癌細胞）にアポトーシスを誘導するための薬剤、ならびにこの薬剤を用いるアポトーシス誘導及び癌の治療方法に関する。

#### 背景技術

アポトーシス (apoptosis) は、生理的条件下で細胞自らが積極的に引き起こす細胞死であり、環境悪化による細胞死（壊死：ネクロシス）と明確に区別されている。このアポトーシスは、細胞核の染色体凝集、細胞核の断片化、細胞表層微絨毛の消失、細胞質の凝集等を形態学的な特徴としている。アポトーシスを生じた細胞は萎縮し、細胞内容物は外部に放出されずにマクロファージや周囲の細胞に速やかに取り込まれるため、炎症が引き起こされず、周囲の細胞に影響を与えることはない。従って、その存在が宿主生物にとって有害である細胞（例えば癌細胞等）にアポトーシスを誘導することによって疾患を治療する試みが多くなされている。

これまでに、アポトーシスを誘導する手段、因子としては、例えばグルココルチコイド処理、サイトトキシック-T 細胞による細胞障害、ホルモン依存性組織の萎縮、放射線照射、NK 細胞、キラー細胞、腫瘍壊死因子 (TNF)、リンホトキシン (LT) 等のサイトカイン類等が報告されている (Wyllie, A. H., Nature 284:555-556, 1986; Wyllie, A. H. et al., Int. Rev. Cytol. 68:251, 1980; Duvall, E. and Wyllie, A. H., Immunology Today, 7:115-119, 1986; Sellins, K. S. et al., J. Immunol. 139:3199, 1987; Yamada, T. et al., Int. J. Radiat. Biol. 53:65, 1988; Schmid, D. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:1881-1885, 1986; John, C. et al., J. Immunol. 129 (4) :1782-1787, 1982; Howell, D.

M. et al., J. Immunol. 140:689-692, 1988; Gillian, B. et al., Eur. J. Immunol. 17:689-693, 1987)。また、ある種の抗体（例えば抗 CD3 抗体、抗 APO-I 抗体等）によってもアポトーシスが誘導されることも知られている (Trauth, B. C. et al., Science 245:301-305, 1989; Smith, C. A. et al., Nature 337:181-184, 1989; Tadakuma, T. et al., Eur. J. Immunol. 20:779, 1990)。さらに、タンパク質合成阻害剤である Cycloheximide は急性白血病細胞に、RNA 合成阻害剤である Actinomycin D は小腸陰窩細胞に、そして両者が HL-60 細胞にそれぞれアポトーシスを誘導することも報告されている (Martin, S. J. et al., J. Immunol. 145:1859-1867, 1990)。

アポトーシスに関連する治療法としては、前記抗 Apo-I 抗体による癌治療の試みの他、芽球の活発な増殖に起因する骨髄異形成症候群(MDS)に対する etoposide や aclarubicin の投与が検討されている (Shibuya, T., J. Clinical and Experimental Medicine 160 (5) :319-323, 1992)。これらの他にも、アポトーシスの誘導方法やそのための薬剤組成物の発明が知られている（例えば、特開 2001-275681 号公報；特表 2002-526109 号公報；特表平 10-508575 号公報；特開平 9-328425 号公報；国際公開第 WO95/28154 号パンフレット等）。

一方、c-myc 遺伝子にコードされる c-Myc タンパク質は、細胞の増殖や分化、細胞周期といった細胞の生命活動に極めて重要であるばかりか、細胞の腫瘍化(形質転換)にも深く関与している。多くの癌組織で c-Myc タンパク質の発現増大が認められ、c-myc 遺伝子導入により細胞の腫瘍化が認められる。さらにこの c-Myc タンパク質はアポトーシスとも関係しており、c-Myc タンパク質の細胞内の発現量が増加しても減少してもアポトーシスが誘導される (Thompson, E. B. Ann. Rev. Physiol. 60: 575-600, 1998)。例えばヒト白血病細胞におけるグルココルイチコイドを用いた実験ではアポトーシス誘導に c-myc 遺伝子の抑制が必須である (Thulasi, R. et al., J. Biol. Chem. 268: 18306-18312, 1993; Zhou, F. et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 73:195-202, 2000; Thompson, E. A. et al., Cancer Res., 51: 5544-5550, 1991; Helmberg, A. et al., EMBO J., 14: 452-60, 1995)。B 細胞を用いた系ではアポトーシスを誘導する化学物質はいずれも c-myc 遺伝子の発現抑制と深くかかわっている (McCormack, J. E. et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. U S A. 81:5546-5550, 1984; Sonenshein, G. E., J. Immunol. 158:1994-1997, 1997; Fischer, G. et al., J. Exp. Med., 179:221-228, 1994; Wu, M. et al., Mol. Cell. Biol. 16:5015-5025, 1996)。また、c-myc のアンチセンスオリゴヌクレオチドをいくつかの種類の細胞に導入するとアポトーシスが誘導される (Thompson, E. B., Ann. Rev. Physiol. 60: 575-600, 1998)。一方、IL-3 依存性の骨髄細胞において、IL-3 を枯渇させると同時に c-myc 遺伝子を強制発現させるとアポトーシスが誘導される (Askew, D. S. et al., Oncogene 6: 1915-1922, 1991)。また血清を取り除いた培地で Rat1 線維芽細胞に c-myc 遺伝子を強制発現させるとアポトーシスが誘導される (Evan, G. I. et al., Cell 69: 119-128, 1992)。

この c-Myc タンパク質は c-myc 遺伝子の転写により產生され、c-myc 遺伝子は多くの転写因子によって厳密に制御されているが、それがどのように転写制御されているのかについては不明の点が多い。例えば、70-80%の大腸癌で異常の見られる APC (adenomatous polyposis coli) 遺伝子は、癌発生の最も初期に異常が起こるといわれている。APC タンパク質は、Wnt/Wingless シグナル伝達経路により安定化される  $\beta$  カテニンに結合してその働きを抑制している。 $\beta$  カテニンは転写因子 Tcf/Lef と結合して c-myc 遺伝子の転写を活性化する。従って APC 遺伝子に異常が起こると  $\beta$  カテニンの活性を抑制できずに c-myc 遺伝子が持続的に活性化され、細胞の増殖がひきおこされると考えられている。

c-Myc タンパク質の発現は Wnt/Wingless シグナル伝達経路以外にも多くの転写因子の影響を受けている。例えばヒト前骨髓性白血病細胞である HL60 は DMSO (Dimethyl sulfoxide; Me<sub>2</sub>SO)、retinoic acid、phorbol esters、ビタミン D 誘導体等種々の化学物質により分化誘導され、その際には細胞内 c-Myc タンパク質の発現が減弱することが知られている。これらの事実は、種々の分化誘導物質が様々な転写因子を活性化し c-myc 遺伝子に影響を与えるが、最終的には一つの経路に集約されて c-myc 遺伝子の転写を抑制していることが示唆される。

このような考え方から c-myc 遺伝子の上流のどの部位がその転写に影響を与えるかが解析された結果、c-myc 遺伝子の転写開始部位の 1.5kb も上流の百数十塩基の部位が c-myc 遺伝子の転写に極めて重要であることが示され、FUSE (Far

Upstream Element) と命名された (Avigan, M. et al., J. Biol. Chem., 265:18538-18545, 1990)。次に FUSE に結合する蛋白質が oligonucleotide affinity chromatography によって解析され、70kDa の分子量を有する FBP (FUSE 結合タンパク質 ; FUSE Binding Protein) が同定された。またこの FBP タンパク質はそれ自体が強力な転写活性を有し、c-myc 遺伝子を制御している可能性が示されている (Bazar, L. et al., J. Biol. Chem., 270: 8241-8248, 1995; Duncan, R. et al., Genes Dev., 8:465-480, 1994; Michelotti, G. A. et al., Mol. Cell. Biol. 16:2656-2669, 1996)。そしてさらに、この FBP タンパク質に結合（相互作用）するタンパク質として FIR (FBP Interacting Repressor) が同定され (Liu, J. et al., Mol. Cell, 5: 331-341, 2000)、この FIR は基本転写因子 TFIH の機能を抑制することにより c-myc 遺伝子を転写抑制することが示されている (Liu, J. et al., Cell, 104: 353-363, 2001)。ただし、この FIR がアポトーシスを誘導することは一切知られていない。

このように、c-Myc タンパク質は細胞の癌化とアポトーシスに深く関与しており、その発現を制御することによって癌細胞を死滅させることが期待されている。しかしながら、前記のとおり c-Myc タンパク質はその発現量が増大しても減少してもアポトーシスを生じさせるため、その発現制御によるアポトーシス誘導は容易ではない。また、c-Myc タンパク質の発現抑制によるアポトーシス誘導の手段としてグルココルチコイドや c-myc 遺伝子のアンチセンス鎖を用いる方法が提案されているが (Thompson, E. B., Ann. Rev. Physiol. 60: 575-600, 1998; Thulasim, R., et al., J. Biol. Chem. 268: 18306-18312, 1993; Zhou, F. et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 73:195-202, 2000; Thompson, E. A. et al., Cancer Res., 51: 5544-5550, 1991; Helmberg, A. et al., EMBO J., 14: 452-60, 1995)、副作用の点や安定した効果の点で臨床的使用には好ましいものではない。

従って、本発明の課題は、c-myc 遺伝子を標的として、細胞アポトーシスを安定かつ確実に誘導するための新しい手段を提供することにある。

本発明のさらなる課題は、前記アポトーシス誘導の手段を用いて動物個体内的細胞、特にその存在が宿主動物にとって有害となるような細胞にアポトーシスを誘導する方法を提供することにある。

## 発明の開示

本発明者らは上記課題を解決すべく銳意研究を重ねた結果、c-myc 遺伝子の上流にある転写因子 FUSE (Far Upstream Element) に結合する FUSE 結合タンパク質 (FUSE 結合タンパク質；以下、「FBP タンパク質」という) と相互作用する FIR (FBP Interacting Repressor) タンパク質が、c-Myc タンパクの発現を抑制するとともに、アポトーシスを誘導できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

- (1) FBP タンパク質と相互作用するタンパク質を有効成分として含有するアポトーシス誘導剤。  
配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質；  
配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつアポトーシス誘導活性を有するタンパク質；又は、それらの部分ペプチドである、(1) に記載のアポトーシス誘導剤。
- (2) FBP タンパク質と相互作用するタンパク質、  
配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質；  
配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつアポトーシス誘導活性を有するタンパク質；又は、それらの部分ペプチドである、(1) に記載のアポトーシス誘導剤。
- (3) FBP タンパク質と相互作用するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを有効成分として含有するアポトーシス誘導剤。
- (4) FBP タンパク質と相互作用するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、  
配列表の配列番号 1 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；  
配列表の配列番号 1 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、  
かつアポトーシス誘導活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；  
又は、それらの部分断片である、(3) に記載のアポトーシス誘導剤。
- (5) 細胞内に導入可能な形態を有していることを特徴とする、(1)～(4) のいずれかに記載のアポトーシス誘導剤。
- (6) 細胞内に導入可能な形態がベクターである、(5) に記載のアポトーシス誘導剤。
- (7) 癌の治療のために用いる、(1)～(6) のいずれかに記載のアポトーシス誘導剤。

- (8) c-myc 遺伝子発現により増殖する細胞にアポトーシスを誘導する方法であつて、(1)～(7)のいずれかに記載のアポトーシス誘導剤を細胞に接触させる工程を含むことを特徴とするアポトーシス誘導方法。
- (9) 細胞が癌細胞である、(8)に記載の方法。
- (10) 細胞が哺乳動物の体内にある細胞である、(8)又は(9)に記載の方法。
- (11) 哺乳動物がヒトである、(10)に記載の方法。
- (12) 哺乳動物に対して、配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質；配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつアポトーシス誘導活性を有するタンパク質；又はそれらの部分ペプチドの有効量を投与することを特徴とする、癌の治療方法。
- (13) 哺乳動物に対して、配列表の配列番号1に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；配列表の配列番号1に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつアポトーシス誘導活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；又はそれらの断片の有効量を投与することを特徴とする、癌の治療方法。
- (14) 哺乳動物がヒトである(12)又は(13)に記載の方法。

なお、本発明において、「FBP タンパク質と相互作用するタンパク質」とは、FBP タンパク質と結合して、FBP タンパク質の機能（すなわち c-myc 遺伝子の転写活性）に対して抑制的に働くタンパク質を意味する。

また「ポリヌクレオチドが細胞内に導入可能な形態」とは、ポリヌクレオチドが細胞内に導入され、そのポリヌクレオチドがコードするタンパク質又はペプチドが発現可能である形態を意味する。

また「タンパク質」及び「ペプチド」とは、アミド結合（ペプチド結合）によって互いに結合した複数個のアミノ酸残基から構成された分子を意味する。「ポリヌクレオチド」とは、プリン又はピリミジンが糖にβ-N-グリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステル（ATP、GTP、CTP、UTP；又は dATP、dGTP、dCTP、dTTP）が 100 個以上結合した分子を言い、「オリゴヌクレオチド」とは 2-99 個連結した

分子を言う。

本発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく述べる。また本発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、本発明の治療方法等に使用可能な薬剤の調製は Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990 に、遺伝子工学及び分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995 等に記載されている。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、FIR タンパク質が c-myc 転写抑制能を有するか否かを調べた CAT アッセイの結果である。

図 2 は、完全長 FIR 遺伝子 (HA-FIR) 又はその欠失変異体 (HA-FIR $\Delta$ N77) を導入した HeLa 細胞について、c-Myc タンパク質の発現を免疫組織化学染色により可視化した蛍光顕微鏡写真である。

図 3 は、完全長 FIR 遺伝子 (HA-FIR) 又はその欠失変異体 (HA-FIR $\Delta$ N77) を導入した HeLa 細胞について、フローサイトメトリー解析 (2 色 FACScan 解析) によって c-Myc タンパク質の発現を定量した結果を示す

図 4 は、完全長 FIR 遺伝子 (HA-FIR) 又はその欠失変異体 (HA-FIR $\Delta$ N77) を導入した HeLa 細胞について、アポトーシス誘導を調べた蛍光顕微鏡写真である。

図 5 は、完全長 FIR 遺伝子 (HA-FIR) 又はその欠失変異体 (HA-FIR $\Delta$ N77) を導入した HeLa 細胞について、フローサイトメトリー解析 (2 色 FACScan 解析) によってアポトーシス細胞を定量した結果を示す

図 6 は、FIR 遺伝子のみ、FIR 遺伝子と c-myc 遺伝子の両方を導入した HeLa 細胞について、FIR タンパク質及び c-Myc タンパク質の発現を免疫組織化学染色により可視化した蛍光顕微鏡写真である。

図 7 は、FIR 遺伝子のみ、FIR 遺伝子と c-myc 遺伝子の両方を導入した HeLa 細胞について、アポトーシス誘導を調べた蛍光顕微鏡写真である。

図 8 A は、大腸の腫瘍組織 (T) 及び非腫瘍組織 (N) の FIR タンパク質レベルをイムノプロッティングにより分析した結果を示す。

図 8 B は、大腸の腫瘍組織 (T) 及び非腫瘍組織 (N) の全 RNA に対して RT-PCR を行った結果を示す。

図 8 C は、リアルタイム定量的 PCR によって検出した大腸の腫瘍組織 (T) 及び非腫瘍組織 (N) の FIR mRNA 発現レベルのヒストグラムを示す。

図 8 D は、FIR と c-myc mRNA の大腸の腫瘍組織 (T) / 非腫瘍組織 (N) 発現比の相関を示す。

図 9 は完全長 FIR 遺伝子 (FIR 野生型)、及び大腸癌組織由来の FIR 変異体 (118T-FIR 変異体、28T-FIR 変異体) を導入した HeLa 細胞について、c-Myc タンパク質の発現を免疫組織化学染色により可視化した蛍光顕微鏡写真である。

図 10 は完全長 FIR 遺伝子 (FIR 野生型)、及び大腸癌組織由来の FIR 変異体 (118T-FIR 変異体、28T-FIR 変異体) を導入した HeLa 細胞について、アポトーシス誘導を調べた蛍光顕微鏡写真である。

図 11 は、子宮頸癌 (HeLa)、食道癌 (T. Tn) 細胞の生存率を MTT アッセイによって測定したグラフを示す。

図 12 は、FIR アデノウイルスベクター感染後の大腸癌 (SW480, DLD1)、子宮頸癌 (HeLa)、食道癌 (T. Tn) 細胞株における核内及び細胞質内の FIR タンパク質発現をイムノプロッティングにより分析した結果を示す。

以下、本発明を詳細に説明する。本願は、2003 年 4 月 21 日に出願された日本国特許出願 2003-116299 号の優先権を主張するものであり、該特許出願の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

## 1. アポトーシス誘導剤

本発明のアポトーシス誘導剤は、有効成分として、FBP タンパク質と相互作用するタンパク質、又は FBP タンパク質と相互作用するタンパク質をコードするポ

リヌクレオチドを細胞内に導入可能な形態で含有することを特徴とする。

上記 FBP タンパク質、好ましくはヒト FBP タンパク質と相互作用するタンパク質としては、ヒト FIR タンパク質 (Liu, J. et al., Mol. Cell, 5: 331-341, 2000; Liu, J. et al., Cell, 104: 353-363, 2001; GenBank/NM\_14281)、ヒト SIAHBP1 (siah binding protein 1: GenBank/BC008875)、ヒト SIAHBP1 の転写バリアント 1 (GenBank/NM\_078480)、ヒト SIAHBP1 の転写バリアント 2 (GenBank/NM\_014281) 等が挙げられるが、これらの中でも配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するヒト FIR タンパク質が特に好ましい。

本発明で用いるヒト FIR タンパク質には、配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつアポトーシス誘導活性を有するタンパク質も含まれる。

ここで、欠失、置換若しくは付加されてもよいアミノ酸の数としては、好ましくは、1 個から数個である。例えば、配列番号 2 に示すアミノ酸配列の 1 ~ 10 個、好ましくは 1 ~ 5 個のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号 2 に示すアミノ酸配列に 1 ~ 10 個、好ましくは 1 ~ 5 個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列の 1 ~ 10 個、好ましくは 1 ~ 5 個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。

アミノ酸の欠失、付加及び置換は、上記タンパク質をコードする遺伝子を、当該技術分野で公知の手法によって改変することによって行うことができる。遺伝子に変異を導入するには、Kunkel 法又は Gapped duplex 法等の公知手法又はこれに準ずる方法により行うことができ、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えば Mutant-K (TAKARA 社製) や Mutant-G (TAKARA 社製) )などを用いて、あるいは、TAKARA 社の LA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて変異が導入される。

ここで、「アポトーシス誘導活性」とは、細胞を収縮させ、核を断片化させる活性をいい、この活性は、例えば、遺伝子を HeLa 細胞等に導入し、過剰発現させ、その細胞の形態変化の観察、FACS 分析により確認することができる。

また、「アポトーシス誘導活性を有する」とは、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質が保持する該活性と実質的に同等であることをいう。

上記のタンパク質中の部分アミノ酸配列を含むペプチド（部分ペプチドともいう）も本発明の範囲に含まれる。かかる部分ペプチドを構成するアミノ酸数は、少なくとも 10 個以上、好ましくは 30 個以上、より好ましくは 80 個以上である。

上記のタンパク質又はその部分ペプチドは、必要に応じて塩の形態、好ましくは生理学的に許容される酸付加塩の形態で提供され得る。そのような塩としては、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）の塩、有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）の塩等が挙げられる。

上記タンパク質は、公知のアミノ酸配列（例えば FIR タンパク質の場合は配列番号 2 のアミノ酸配列）に基づいて化学合成する方法や、発現ベクターからのインビトロ転写や、発現ベクターによる形質転換細胞の発現産物として単離精製する方法等によって取得することができる。例えば、タンパク質をインビトロ翻訳で発現させる場合には、RNA ポリメラーゼプロモーターを有する発現ベクターを、プロモーターに対応する RNA ポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加すれば、タンパク質をインビトロで生産することができる。RNA ポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6 などが例示できる。これらの RNA ポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript II などが例示できる。また、タンパク質を、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNA クローニング部位、タミネーター等を有する発現ベクターに該タンパク質をコードする DNA 断片を組換えて発現ベクターを作成する。この発現ベクターで宿主細胞を形質転換すれば、タンパク質を発現する形質転換体細胞を得ることができ、この形質転換体を培養すれば、その培養物から目的のタンパク質を大量生産することができる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC 系、pBluescript II、pET 発現システム、pGEX 発現システムなどが例示できる。さらに、タンパク質を真核細胞で発現させる場合には、該タンパク質をコードする DNA 断片を、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A) 付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクタ

ーを作製する。このベクターを真核細胞内に導入すれば、目的のタンパク質を発現する形質転換真核細胞を得ることができる。発現ベクターとしては、pKAI、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBV ベクター、pRS、pYES2 などが例示できる。真核細胞としては、ヒト胎児腎臓細胞 HEK293、サル腎臓細胞 COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO などの哺乳動物培養細胞、あるいはヒト臓器から単離した初代培養細胞などが使用できる。出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞なども使用できる。発現ベクターを細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAE デキストラン法など公知の方法を用いることができる。形質転換細胞で発現させたタンパク質を単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせて行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

また、部分ペプチドは、公知のペプチド合成法又は上記タンパク質を適当なペプチダーゼ（例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ）で切断することによって製造することができる。ペプチド合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。

また、本発明のアポトーシス誘導剤に使用するポリヌクレオチドとしては、配列番号 1 に示す塩基配列を有する、ヒト FIR タンパク質をコードするポリヌクレオチド好ましい。

本発明で用いるヒト FIR タンパク質をコードするポリヌクレオチドまた、配列番号 1 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジメントな条件下でハイブリダイズし、かつアポトーシス誘導活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。

ここで、ストリンジメントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、相同性が高い核酸、すなわち配列番号 1 で表わされる塩基配列と 70 % 以上、好ましくは 80 % 以上、より好ましくは 90 % 以上、最も好ましく 95 % 以上の相同性を有す

る塩基配列からなるDNAの相補鎖がハイブリダイズし、それより相同性が低い核酸の相補鎖がハイブリダイズしない条件が挙げられる。より具体的には、ナトリウム濃度が150～900mM、好ましくは600～900mMであり、温度が60～68℃、好ましく65℃での条件をいう。

前記の各タンパク質をコードするゲノムDNA、ゲノムDNAの転写産物であるmRNA、このmRNAを鑄型として合成されるcDNA等を利用することができるが、cDNAが特に好ましい。このcDNAは、前記の公知配列を利用し、公知の方法によって取得することができる。例えば、公知の方法 (Mol. Cell Biol. 2, 161-170, 1982; J. Gene 25, 263-269, 1983; Gene, 150, 243-250, 1994) を用いてcDNAライブライマーを合成し、前記の公知配列(例えばFIRタンパク質をコードする配列番号1)の塩基配列に基づいて作製したプローブDNAを用いて、目的のcDNAを単離することができる。得られたcDNAは、例えば、PCR (Polymerase Chain Reaction)法、NASBN (Nucleic acid sequence based amplification)法、TMA (Transcription-mediated amplification)法及びSDA (Strand Displacement Amplification)法などの通常行われる遺伝子增幅法により増幅することができる。また、公知配列に基づいて作製したプライマーセットを用い、ヒト細胞から単離したmRNAを鑄型とするRT-PCR法によっても必要量の各cDNAを得ることができる。プライマーセットは、プライマー設計用の市販のソフトウェア、例えばOligoTM [National Bioscience Inc. (米国) 製]、GENETYX [ソフトウェア開発(株) (日本) 製]等を用いることによって作製することができる。

上記のタンパク質又はポリヌクオチドを細胞内に導入可能な形態とすることは、例えば以下の手段がある。

タンパク質は、例えば、その構造や機能を変更することなく、かつ薬理学的に許容される担体溶液にタンパク質分子を混合して製剤化することにより細胞内に導入可能な形態とすることができます。

このような薬剤は、例えばin vitro細胞に対してはマイクロインジェクション法により細胞内に導入することができる。あるいは、脂質による細胞内導入法 (BioPORTER (Gene Therapy Systems社、米国)、Chariot (Active Motif社、米国)等)を採用することもできる。

また別の態様としては、タンパク質（ポリペプチド）の N 端側に細胞膜通過ペプチドを連結させた融合ポリペプチドとすることによって、タンパク質を細胞内に導入可能な形態することもできる。この細胞膜通過ペプチドを備えることによって、タンパク質は細胞膜を通過して細胞内に取り込まれる。細胞膜通過ペプチドとしては、HIV-1・TAT の PTD (protein transduction domain) 又はショウジョウバエのホメオボックスタンパク質アンテナペディアの PTD 等を使用することができる。例えば HIV-1・TAT の場合にはそのアミノ酸配列及びその cDNA の塩基配列が公知であり (Science, 285:1569-1572, 1999; GenBank Accession No. U39362 M96155)、その PTD に相当する領域 (HIV・TAT の 47~57 番アミノ酸配列) をコードする DNA 断片を前記 cDNA と連結して融合 DNA 断片を作成し、この融合 DNA 断片を大腸菌等の宿主細胞で発現させることによって、N 末端側に PTD ペプチドを連結し融合ポリペプチドを作成することができる。また、アンテナペディアの PTD も公知であり (例えば、GenBank Accession No. AE001573)、同様にして PTD を連結した融合ポリペプチドを作成することができる。あるいはまた、2 個の架橋剤 (例えば、EDC や β-アラニン等) を介して、ポリペプチドと PTD ペプチドを結合させる方法によって細胞膜通過ペプチドを連結した融合ポリペプチドを作成することもできる。

一方、ポリヌクレオチドは、例えば、発現ベクターに組み込むことによって細胞内に導入可能な形態とすることができます。発現ベクターは、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A) 付加部位等を有する公知の真核細胞用発現ベクターを使用することができ、この発現ベクターのクローニングサイトに、前記のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを挿入することによってポリペプチド発現ベクターを構築することができる。

この発現ベクターは、*in vitro* 細胞（培養細胞）に対しては、例えば電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAE デキストラン法等の公知の方法によって細胞内に導入することができる。

また、*in vivo* 細胞（すなわち動物個体内の細胞）に対しては、細胞への取り込みの促進や標的細胞への指向性を高める目的で、例えば、ウイルス性又は非ウイルス性の遺伝子導入用ベクターなどの手段により細胞内に導入することができ

る。このような形態にした薬剤は、遺伝子治療用として生体内に導入することができる（例えば、特開2003-24092号公報、特開2003-501445号公報等）。ここで、ウイルス性ベクターとしては、例えばアデノウイルスペクター、レトロウイルスペクター、レンチウイルスペクター、AAV（アデノ随伴ウイルス）ベクター、ワクシニアウイルスペクター、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）ベクター、ヘルペスウイルスペクター等が挙げられる。また、非ウイルス性ベクターとしては、リポソーム、人工脂質ベシクル、中空ナノ粒子、デンドリマーなどの高分子化合物等が挙げられる。この場合、市販の導入用試薬（リポフェクチン、リポフェクトアミン、DMRIE-C（Invitrogen社製）、Metafectene、DOTAP（BioTex社製）、Tfx試薬（Promega社製）等が利用できる。

アポトーシスは正常な発生・分化に不可欠な生理的細胞死であり、正常な生体組織の細胞回転などにおいて個々の細胞に起こっている。そのため、アポトーシスが過剰に減少すると多くの機能障害の原因になることが判明している。従って、本発明のアポトーシス誘導剤は、アポトーシスの減少に起因する疾患の治療及び／又は予防剤として使用できる。アポトーシスの減少に起因する疾患としては、代表的には、悪性腫瘍（胃癌、大腸癌、乳癌、肺癌、食道癌、前立腺癌、肝癌、腎臓癌、膀胱癌、皮膚癌、子宮癌、脳腫瘍、骨肉腫、骨髄腫瘍など）であるが、白血病、自己免疫疾患（例えば、I型糖尿病、多発性硬化症、全身性エリマトーデス、慢性関節リウマチなど）、ウイルス感染疾患（HIV感染など）、肝炎、などが挙げられ、これらに限定はされない。

本発明のアポトーシス誘導剤は、各種製剤形態に調製し、経口又は非経口的に全身又は局所投与することができる。本剤を経口投与する場合は、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、内用水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤等に製剤化するか、使用する際に再溶解させる乾燥生成物にしてもよい。また、本剤を非経口投与する場合は、静脈内注射剤（点滴を含む）、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤、皮下注射剤、坐剤などに製剤化し、注射用製剤の場合は単位投与量アンプル又は多投与量容器の状態で提供される。

これらの各種製剤は、製剤上通常用いられる賦形剤、增量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、潤滑剤、界面活性剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、

矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤、等張化剤等などを適宜選択し、常法により製造することができる。

本発明のアポトーシス誘導剤の投与量は、投与対象の年齢、投与経路、投与回数、症状、剤型等により異なるが、タンパク質又はペプチドの治療的有効量（すなわち、有効量）は、約 0.001～30mg/kg 体重の範囲、好ましくは約 0.01～25mg/kg 体重、より好ましくは約 0.1～20mg/kg 体重、さらにより好ましくは約 1～10mg/kg、2～9mg/kg、3～8mg/kg、4～7mg/kg 又は 5～6mg/kg 体重の範囲であり、1 日 1 回から数回に分けて 1 日以上投与される。またタンパク質をコードするポリヌクレオチドを遺伝子治療等の方法によって導入する場合は、前記の範囲量のタンパク質を発現しうるポリヌクレオチドを投与すればよい。

## 2. アポトーシス誘導方法

本発明のアポトーシス誘導方法は、c-myc 遺伝子発現により増殖する細胞に前記アポトーシス誘導剤を細胞に接触させることを特徴とする。

なお、c-myc 遺伝子は殆ど全ての動物細胞においてその増殖に関与することから、本発明の方法は実際には全ての動物細胞のアポトーシスを誘導するために適用することができるが、特に、c-myc 遺伝子の過剰発現によって癌化した細胞を対象とすることが好ましい。

本発明の方法は、*in vitro* 細胞（培養細胞）を対象としてもでき、*in vivo* 細胞（動物体内的細胞）を対象とすることができる。*in vitro* 細胞を対象とする場合は、前記のとおり、タンパク質発現ベクターを電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAE デキストラン法など公知の方法で細胞内に導入する方法、またタンパク質それ自体の溶液をマイクロインジェクションする方法や脂質を介して細胞に導入する方法、あるいは PTD ペプチド融合タンパク質を培養細胞に接触させる方法等によって実施することができる。

*in vivo* 細胞を対象とする場合は、前記のとおり、ポリヌクレオチドを遺伝子治療に準じた方法により体内細胞に導入する方法や、タンパク質それ自体の溶液を体内細胞にマイクロインジェクションする方法や脂質を介して細胞に導入する方法、あるいは PTD ペプチド融合タンパク質溶液を体内に投与する方法等によっ

て実施することができる。

*in vivo* 細胞は、全ての動物個体内の細胞を対象とすることができるが、特に、有用動物（家畜、愛玩動物等）の癌治療等を目的とするアポトーシス誘導が好ましい。また、ヒトの癌治療を目的とするアポトーシス誘導がさらに好ましい。

### 3. 癌の治療方法

本発明の癌の治療方法は、癌を有する哺乳動物に対して前記アポトーシス誘導剤を癌の治療上有効な量で投与することを特徴とする。

ここで、哺乳動物としては、ヒト、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ等が挙げられる。「癌の治療上有効な量」とは、増殖中の癌細胞に対する本剤の投与によって、癌細胞の増殖の停止、腫瘍サイズの縮小又は消失をもたらす量をいう。具体的な投与量は、投与経路、患者の年齢及び体重、癌の種類及び悪性度、転移又は再発の有無などにより適宜増減すべきである。

投与形態としては、静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、局所、腫瘍内、経口、経皮、直腸内、膣内、鼻腔内、舌下投与等が挙げられる。具体的には、例えば、外科手術により容易に接近可能な各種臓器内の固形腫瘍に対しては腫瘍内に又はその近傍に定位固定針などを用いて局所注入することによって投与すればよく、白血病などの非固形腫瘍、脳腫瘍などの外科的手術により接近しにくい部位の癌、転移性癌については、静脈内注射によって投与することができる。その他、癌の種類や部位によって、上記の投与方法を適宜選択して使用することができる。

遺伝子治療の形態としては、標的細胞を体外に取り出して遺伝子導入を行う体外法 (*ex vivo* 法)、体内に遺伝子を導入する体内法 (*in vivo* 法) があるが、本発明のアポトーシス誘導剤はいずれの治療形態にも適用される。体外法では患者由来の細胞を一旦体外で培養し、上記ポリヌクレオチドの導入処理をした後に患者に投与すればよいし、体内法では上記のポリヌクレオチド導入ベクターを直接患者体内（臓器組織、皮膚、筋肉など）へ投与すればよい。

また、かかる癌治療は、外科的手術、化学療法、及び放射線治療を含む、周知の癌治療手段と併用してもよい。

## 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

### (実施例 1) 発現プラスミドの作製と癌組織標本試料の採取

#### (1) 発現プラスミドの作製

完全長 FIR cDNA (配列番号 2) 及び FIR の転写活性部位である N 末側 77 個のアミノ酸配列 (配列番号 2 のアミノ酸配列の 1 位から 77 位までのアミノ酸配列) が欠失した FIR 変異体を pCGNM2 ベクタープラスミド (Liu, J. et al., Cell, 104;353-363, 2001) にクローニングし、それぞれの発現プラスミド (HA-FIR と HA-FIR $\Delta$ N77) を作製した。

また、ヒト c-Myc 発現ベクターとして、pcDNA3.1-c-myc、GeneStorm<sup>TM</sup> Expression-Ready Clones (Invitrogen Co., AL) を購入した。

#### (2) ヒト大腸癌組織標本の採取

術前に文書による同意を得た原発性大腸癌の患者 15 例から外科的に組織を切除した。切除試料は、腫瘍上皮組織及び腫瘍から 5-10cm 離れた非腫瘍上皮組織から手術による切除後、1 時間以内に採取した。二人の病理医が全ての組織試料が腺癌であることを顕微鏡観察によって確認した。全ての切除試料は直ちに液体窒素中に置き、-80°C にて分析まで保存した。

### (実施例 2) FIR による外来性 c-myc 遺伝子の転写抑制試験

外来性の c-myc プロモーターに対して FIR が転写抑制能を有するか否かを調べるため、c-myc プロモーターを chloramphenicol acetyl transferase (CAT) 遺伝子の上流に持つレポータープラスミドを、実施例 1 で作製した HA-FIR 又は HA-FIR $\Delta$ N77 と HeLa 細胞にコトランスフェクトし、CAT の発現を調べた。

#### (1) 方法 (CAT アッセイ)

HeLa 細胞を 10% fetal calf serum を加えた Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco-BRL) で培養し、電気穿孔法 (electroporation) により HA-FIR 又は HA-FIR $\Delta$ N77 を、c-myc プロモーターを chloramphenicol acetyl transferase

(CAT) 遺伝子の上流に持つレポータープラスミドとともに導入した。遺伝子導入から 48 時間後、文献 (Tomonaga, T. et al., J. Biol. Chem., 270: 4875-4881, 1995) の記載に従い、CAT の発現を調べた。

## (2) 結果

図 1 に CAT アッセイの結果を示す。FIR は顕著に CAT の発現を抑制した。しかし、アミノ末端を削除した変異 FIR は正常の FIR に比べ CAT の発現抑制が減弱していた (図 1)。

### (実施例 3) FIR による内在性 c-myc 遺伝子の転写抑制試験

細胞内にもともと存在する c-myc 遺伝子のプロモーター（内在性の c-myc プロモーター）が FIR によって転写抑制されるか否かを免疫組織化学染色、及びフローサイトメトリー解析により調べた。

#### (1) 方法

##### (1-1) 免疫組織化学染色

HeLa 細胞をカバーガラス上で一晩培養し、Lipofectamine Plus reagents (Gibco BRL) を用い、プラスミド (HA-FIR 及び HA-FIR $\Delta$ N77) をトランスフェクトした。プラスミド導入から 24 時間後、既報 (He, L., et al., Embo J, 19: 1034-1044, 2000) の記載に従い、細胞を処理した。

カバーガラス上の細胞を 4%-パラホルムアルデヒドで固定後、PBS で洗浄し、室温で 1 次抗体と 1 時間反応させた。マウス抗-HA モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA)、ウサギ抗-c-Myc ポリクローナル抗体 (Upstate Biotechnology, NY)、マウス抗 c-Myc モノクローナル抗体 (Oncogene Research Products, CA) をブロッキングバッファーで 500 倍、1,000 倍、500 倍にそれぞれ希釈したものを 1 次抗体として使用した。

その後 PBS で再度洗浄し、二次抗体 [ローダミン標識一抗マウス IgG (Roche)、蛍光イソチオシアネート (FITC) 標識一抗ウサギ IgG (Sigma) をそれぞれ前記ブロッキングバッファーで 1,000 倍及び 500 倍に希釈してもの] を反応させた。細胞核の DNA を diamidinophenylindole (DAPI, 1  $\mu$ g/ml) で染色し、免疫蛍光顕微鏡 (Leica QFISH; Leica Microsystems, Tokyo, Japan) で観察した。

### (1-2) フローサイトメトリー解析

FIR による c-Myc 発現抑制を定量するために細胞を 2 色 FACScan 解析 (He, L., et al., Embo J, 19: 1034–1044, 2000) に供した。すなわち、トランスフェクション 22 時間後、細胞をトリプシン処理し、PBS で洗浄後、−20°C のエタノールで少なくとも 2 時間固定し、細胞を冷 PBS で二回洗浄後、マウス抗-HA 抗体及びウサギ抗-c-Myc 抗体を 1 次抗体として反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体 [FITC-結合-抗-ウサギ IgG (Sigma) 及び R-PE-結合-抗-マウス IgG (PharMingen) をそれぞれ 200 倍に希釀したもの] を反応させた。

各サンプルにつき 10,000 個の細胞を、c-Myc-FITC を FL1 強度、HA-PE を FL2 強度として検出するフローサイトメトリーで解析した。トランスフェクトされた細胞 (PE-陽性細胞) を X 軸にとり、FITC-陽性細胞 (c-Myc 発現細胞) を Y 軸にとって表示した。

### (2) 結果

HA-FIR 及び HA-FIR $\Delta$ N77 を HeLa 細胞にトランスフェクトし、内在性 c-Myc の発現を免疫組織化学染色によって可視化した結果を図 2 に示す。

HA-FIR 発現細胞では c-Myc 発現レベルが大きく抑制されたのに対し (図 2、上段のパネル、▲印)、HA-FIR $\Delta$ N77 発現細胞ではその抑制活性が弱まっていた (図 2、下段のパネル、矢印)。

HA-FIR 及び HA-FIR $\Delta$ N77 を HeLa 細胞にトランスフェクトし、内在性 c-Myc の発現をフローサイトメトリー解析 (2 色 FACScan 解析) より定量した結果を図 3 に示す。HA-FIR は c-Myc 発現を抑制するが (図 3、上段、左側のパネル)、HA-FIR $\Delta$ N77 ではそのような作用はなく (図 3、上段、中央のパネル)、HA ベクターのみでは抑制しなかった (図 3、上段、右側のパネル)。

また、HA-FIR 陽性集団内では、c-Myc レベルが顕著にゲート領域で二峰性となり (図 3、上段、左側のパネル)、c-Myc レベルが HA-FIR トランスフェクト細胞において急激に減少した。HA-FIR $\Delta$ N77 又は HA-tag トランスフェクト細胞においては、c-Myc 発現レベルがトランスフェクト細胞及び非トランスフェクト細胞間で一様に区別できなかった (図 3、上段の中央及び右側のパネル)。

下段のパネルは上段のパネルにおいて印をつけたゲート領域における c-Myc 発

現のヒストグラムを示す。ゲート領域における c-Myc の平均値 (Geo-mean) は、 HA-FIR に対しては 19.4 (8.0)、 HA-FIR $\Delta$ N77 に対しては 22.6 (9.6)、 HA 空ベクターに対しては 35.5 (30.0) であった。

以上より、FIR は内在性 c-Myc 発現を抑制し、FIR アミノ末端ドメインはその抑制に必須であることが確認された。

#### (実施例 4) FIR による細胞死 (アポトーシス) 誘導

FIR は内在性の c-myc 発現を抑制するので、FIR 高発現によってアポトーシスを誘導できるかどうかを、全長 FIR、及び N 端側の 76 アミノ酸配列を欠失した変異 FIR を用いて調べた。

##### (1) 方法 (TUNEL 法)

150 fmol の HA-FIR 又は HA-FIR $\Delta$ N77、空ベクタープラスミドを 6-ウェルプレート内の HeLa 細胞にトランスフェクトし、60 時間後にアポトーシス誘導を調べた。アポトーシス細胞は製造業者の指示に従い、TUNEL 法 (Apoptosis Detection System, Fluorescein. Promega, WI, USA) により検出した。すなわち、カバーグラス上で培養した HeLa 細胞を 4%-パラホルムアルデヒドにて 10 分間氷上で固定した。PBS で洗浄後、細胞を 0.5% トリトン-X-100 の PBS 液で 5 分間透析した。PBS で二度洗浄後、FITC 標識-dUTP (MEBSTAIN Apoptosis Kit: Medical & Biological Laboratories, JAPAN) を含むターミナルデオキシトランスクレーブ (TdT) による *in situ* nick-end labeling を用いて DNA のヌクレオソーム内断片化を検出することでアポトーシス細胞を可視化した。

HeLa 細胞を 1 unit/ml DNase I (GenHunter Corporation, Nashville, TN) で処理し、この細胞を陽性コントロールとした。DNA は DAPI III Counterstain (Vysis, Abbott Park, IL) で染色し、蛍光顕微鏡 (Leica QFISH; Leica Microsystems, Tokyo, Japan) で観察した。

2 色 FACScan 解析を行うに際し、細胞をトリプシン処理後、-20°C エタノールで少なくとも 2 時間固定した。PBS で二度洗浄後、細胞を FITC 標識-dUTP を含む 50  $\mu$ l の TdT buffer 中でインキュベートした。その後、250  $\mu$ g の DNase-free RNase A を含む 0.5 ml のヨウ化プロピジウム (PI) 液 (PBS で 5  $\mu$ g/ml に新たに希釈)

に細胞を再懸濁した。

各サンプルにつき 10,000 個の細胞を、 FITC を FL1 強度、 PI を FL2 強度として分析した。PI-陽性細胞を X-軸にとり、 FITC-陽性細胞（アポトーシス陽性細胞）を Y-軸にとって表示した。

## (2) 結果

HA-FIR は DNA 断片化を伴ったアポトーシスを誘導した（図 4、上段、左側のパネル、矢印）。一方、 HA-FIR $\Delta$ N77 又はコントロールベクター（HA 空ベクター）でトランスフェクトした細胞においてはほとんどアポトーシスは起こらなかった（図 4、上段、中央及び右側のパネル）。

図 5 は、 2 色解析によってアポトーシス細胞を定量した結果を示す。各パネルにおける上部-ゲート領域に見られるアポトーシス細胞を図に示した。10,000 個あたりのアポトーシス細胞のパーセンテージは、 HA-FIR では 16.5% 、 HA-FIR $\Delta$ N77 では 6.6% 、 HA 空ベクターでは 2.0% 、そして DNaseI 処理細胞（陽性コントロール）では 75.6% であった。

## （実施例 5） FIR と c-Myc 共発現による細胞死（アポトーシス）誘導

### (1) 方法 (TUNEL 法)

600ng の pcDNA3.1-FIR を 6-ウェルプレートに撒いたセミコンフルエントな HeLa 細胞に、 60ng の c-Myc 発現プラスミド (pcDNA3.1-c-myc) とともに、又は単独でトランスフェクトし、上記と同様に TUNEL 法にて分析を行った。

### (2) 結果

c-Myc 発現は、 c-myc プラスミドを FIR プラスミドとコトランスフェクトした場合に顕著に上昇したのに対し（図 6、中段、右側のパネル）、 FIR 単独をトランスフェクトした場合は顕著に抑制された（図 6、中段、左側のパネル）。核蛍光標識像 (DAPI 染色) では、 c-myc 共発現細胞（図 6、下段、右側のパネル）に比べて、 FIR 単独発現細胞では核が膨張し、分解していることが確認された（図 6、下段、左側のパネル）。

また、アポトーシス細胞の数は、 FIR 単独によるアポトーシス細胞は 21.1% であるのに対し、 c-myc 発現プラスミドとコトランスフェクトした場合は 4.2% と大

幅に減少した（図7）。

また、c-myc プラスミドを FIR プラスミドと種々の割合でコトランスフェクトした場合のアポトーシス細胞の数を調べた結果を表1に示す。これらの結果は FIR によるアポトーシス誘導が c-Myc 抑制のために起こることを示している。

表 1

<u>導入プラスミド</u>							
pcDNA3. 1-FIR (ng)	600	600	600	600	600	600	0
pcDNA3. 1-c-myc (ng)	0	0	10	20	50	60	60
pcDNA3. 1 ベクター (ng)	0	60	50	40	10	0	0
10,000 個細胞当たりの アポトーシス細胞の割合 (%)	17.3	21.1	4.2	5.6	6.7	7.0	7.5

#### (実施例6) 腫瘍及び正常組織における FIR タンパク質、FIR mRNA の解析

##### (1) 方法

###### (1-1) タンパク質抽出及びイムノプロッティング

全タンパク質溶解物は、上記のペアサンプルより以下のようにして調製した。凍結組織試料を Polytron homogenizer (Kinematica, Switzerland) を用いて溶解バッファー [7M 尿素、2M チオ尿素、2% 3-[3-Cholamidopropyl]dimethylammonio-] 1-propanesulfate (CHAPS)、0.1M ジチオスレイトール (DTT)、2% IPG バッファー (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)、40mM Tris] に溶解し、4°Cにて1時間遠心分離した (100,000×g)。上清のタンパク質量をプロテインアッセイ (Bio-Rad, Hercules, CA) によって測定した。タンパク質は 8% アクリルアミドゲルで電気泳動し、tank transfer apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA) 内のフッ化ポリビニリデン膜 (Millipore, Bedford, MA) に移した。膜を 5% スキムミルク PBS 溶液で 1 時間プロックした。それぞれプロッキングバッファーで 1000 倍、500 倍に希釈したウサギ抗-FIR ポリクローナル抗体（抗体産生の可能性を高めるため 2 つの合成ペプチド：GDKWKPPQGTDSIKME (30-45) と EVYDQERFDNSDLSA (528-542) を同時に免疫することによって調製したもの）及びヤギ抗-β-アクチンポ

リクローナル抗体 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) をブロッキングバッファーにてそれぞれ 1000 倍、500 倍に希釈したものを 1 次抗体として用いた。3000 倍に希釈したヤギ抗-ウサギ IgG ホースラディッシュペーオキシダーゼ結合体 (HRP) (Jackson, West Grove, PA) 及び 500 倍に希釈したウサギ抗-ヤギ IgG HRP (Cappel, West Chester, PA) を二次抗体として用いた。膜上の抗原を ECL™ detection reagent (Amersham Pharmacia Biotech) によって検出した。loading コントロールとして  $\beta$ -アクチン抗体を用いるイムノプロッティングを行った。各バンドの強度を NIH Image によって測定した。

#### (1-2) RT-PCR 及びリアルタイム定量的 PCR

全 RNA 及びゲノム DNA を腫瘍及び非腫瘍上皮組織から RNeasy™ Mini Kit 及び DN easy™ Tissues Kit (Qiagen) を用いて抽出した。cDNA を全 RNA から RT-PCR 用 1st strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany) を用いて合成した。この cDNA を鑄型とし、FIR cDNA をプライマー (フォワード : 5'-GGCCCCATCAAGAGCATC-3' (配列番号 3)、リバース : 5'-GGGGCTGGGCCAGGGTCAG-3' ) (配列番号 4) を用いて RT-PCR によって増幅した。対照として、GAPDH cDNA を増幅した。

Light Cycler™ instrument (Roche, Mannheim, Germany) を用いて FIR cDNA のリアルタイム定量的 PCR を、master mixture [LightCycler™ -FastStart DNA Master SYBR Green I; FastStart Taq DNA polymerase, dNTP mixture、バッファー (LightCycler™ DNA Master hybridization probes, Roche)、3.0 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5  $\mu$ M 各センス及びアンチセンスプライマー、及び 1  $\mu$ l の cDNA 鑄型を LightCycler™ capillary 内に含む] からなる 20  $\mu$ l 反応混合物中で実施した。LightCycler™ ソフトウェア version3.3 (Roche) を定量的 RT-PCR の分析のために用いた。プライマーと LightCycler™ 条件の最適の最適化は Nihon Gene Research Laboratories, Inc. で行った。

リアルタイム定量的 PCR による FIR cDNA 増幅のためのプライマーは以下のとおりである (PCR 産物サイズは 275bp)。

フォワード : 5'-GCACCTGGAGTCATCACA-3' (配列番号 5)

リバース : 5'-CGCAGAACCATCACTGTAG-3' (配列番号 6)

これらのプライマーによる PCR 産物を、Light Cycler<sup>TM</sup>の定量カーブを決定するため Qiagen PCR product purification kit にて精製した。

FIR ゲノム DNA もまた以下のプライマーを用いてリアルタイム定量的 PCR によって定量した。

フォワード : 5'-GGAGTCTACAGTGATGGTTC-3' (配列番号 7)

リバース : 5'-TCCTGGTCTGACTTCA-3' (配列番号 8)

ヒト c-myc cDNA 及びヒト  $\beta$ -アクチン cDNA に対するプライマーは以下のとおりである。

(c-myc 用)

フォワード : 5'-GCCTCAGAGTGCATCGAC-3' (配列番号 9)

リバース : 5'-TCCACAGAAACAACATCG-3' (配列番号 10)

( $\beta$ -アクチン用)

フォワード : 5'-TGGAGAAAATCTGGCACCAAC-3' (配列番号 11)

リバース : 5'-AATGGTGTGACCTGGCCGT-3' (配列番号 12)

## (2) 結果

図 8 A にイムノプロッティング結果を示す。各バンドの強度を NIH Image にて測定し、FIR タンパク質レベルの (T) 及び (N) 間の  $\beta$ -アクチンに対する相対平均値を測定した (図の下部)。Dukes stage を図 8 の上部に付記した。FIR レベルは意外にもほとんどの大腸癌組織において対応する非腫瘍上皮と比べて増加していた (図 8 A)。

(T) 及び (N) のペアサンプルから調製した全 RNA に対して RT-PCR を行った結果を図 8 B に示す。(T) における FIR mRNA は、(N) の FIR mRNA より一例 (ケース番号 5) を除いて高かった。GAPDH mRNA レベルもまた内部コントロールとして示した。

リアルタイム定量的 PCR によって検出された (T) 及び (N) の FIR mRNA 発現レベルのヒストグラムを図 8 C に示す。(T) における FIR mRNA は (N) の FIR mRNA より有意に高かった (t-test では  $p < 0.0056$ ; Wilcoxon test では  $p < 0.0008$ )。

また、各大腸癌組織における FIR と c-myc mRNA の (T) / (N) 発現比は有意に相關していた (図 8 D)。FIR 発現レベルの平均は c-myc 発現レベルの平均と顕著に関

連しており、 $Y=0.72+0.22X$  (Y : FIR 発現比 (T/N)、X : c-myc 発現比 (T/N)) で表された。相関係数は 0.70 で、p 値は 0.00019。

これらの結果より、大腸癌における c-Myc の脱制御は FIR のダウンレギュレーションによるのではなく、FIR 機能の損傷による可能性が高いといえる。逆にいえば、FIR は c-Myc 増加と相関する大腸癌においてアップレギュレートされていると考えられる。

#### (実施例 7) FIR のアミノ末端変異の検出及び解析

##### (1) 方法

FIR のアミノ末端領域を以下のプライマーを用いて PCR によって増幅した。

フォワード : 5'-AGACAGCGGAAGGAGCAAGAGTGG-3' (配列番号 1 3)

リバース : 5'-CTGTGCAGCTCGGGGACCTCATA-3' (配列番号 1 4)

FIR アミノ末端領域 (NTD) の PCR 産物を 1 % アガロースゲルに載せ、pGEM™-T Easy vector system (Promega, WI) へのクローニング前に Gel Extraction Kit™ (Qiagen) によって精製し、DNA 配列決定した。直接的な DNA 配列は少なくとも 4 つの異なるプライマーで (フォワード方向から 2 つ、リバース方向から 2 つ) 確認した。変異が検出された場合、DNA 配列決定をフォワード及びリバース方向の両方から少なくとも計 8 回行った。さらに、pGEM™-T Easy ベクターにクローン化した FIR の NTD に変異がある場合、RT-PCR 産物を直接に配列決定してその正確性を確認した。

##### (2) 結果

大腸癌組織から単離された全長 FIRcDNA を配列決定したところ、驚くべきことに、FIR のアミノ末端 (1 位～156 位のアミノ酸) において少なくとも一つの変異を含んでいる例が数例確認された。

完全長 FIRcDNA (HA-FIR)、及び上記変異体のうちの 2 例、28T-FIR 変異体 (コドン 55 において G 欠損 (GGG から GG\_) を有し、コドン 59 で停止する変異体) と 118T-FIR 変異体 (4 つの点変異を有し、そのうち、コドン 90 の変異はアミノ酸置換変異 (His (CGC) から Arg (CAC)) を有する変異体) cDNA クローンを pcDNA3.1 プラスミドにそれぞれクローニングし、HeLa 細胞へ導入して c-Myc 抑制活性とアポト

ーシス誘導について調べた結果をそれぞれ図 9 及び図 10 に示す。

FIR-野生型、118T-FIR 変異体、28T-FIR 変異体の発現を赤色で染色した(図 9、上段のパネル)。FIR-野生型、118T-FIR 変異体は、全細胞において発現しているのに対し、28T-FIR 変異体は核内だけに局在化していた。c-Myc を緑色で染色し(図 9、中段のパネル)、DNA を DAPI III で対比染色した(図 9、下段のパネル)。118T-FIR 変異体及び 28T-FIR 変異体は両方とも FIR-野生型に比べて c-Myc 抑制活性が減少していた。

また、118T-FIR 変異体及び 28T-FIR 変異体は両方ともアポトーシス誘導が損なわれていた(図 10)。

以上より、ヒト大腸癌組織において FIR はそのアミノ末端領域において変異が生じており、この変異が FIR の有する c-Myc の抑制とアポトーシス誘導の機能を損なう原因となっていることが示唆される。

#### (実施例 8) FIR アデノウイルスペクターによる感染試験

FIR アデノウイルスペクター ( $1.01 \times 10^{10}$  ifu/ml) を作成し、子宮頸癌 (HeLa)、食道癌 (T. Tn) の各細胞株に感染させ、細胞増殖抑制を MTT アッセイによって定量化した。コントロールとして  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を発現させ、FIR アデノウイルスペクターと比較した。細胞数を 50% に減少させる FIR アデノウイルスペクターの MOI を測定したところ、HeLa 細胞では 191.4 (532.8)、T. Tn 細胞では 615.1 (1410.6) であった(括弧内は  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の MOI)。図 11 に HeLa 細胞及び T. Tn 細胞の生存率を MTT アッセイによって測定したグラフを示す。c-Myc を高発現するこれらの癌細胞において FIR アデノウイルスペクターの抗腫瘍効果が確認された。

また、FIR アデノウイルスペクター感染後の大腸癌 (SW480, DLD1)、子宮頸癌 (HeLa)、食道癌 (T. Tn) の各癌細胞株における核内及び細胞質内の FIR タンパク質発現をイムノプロッティングにより分析した結果を図 12 に示す。大腸癌 (SW480, DLD1) 細胞、食道癌 (T. Tn) 細胞において、FIR アデノウイルスペクターの感染効率に相違が認められた。T. Tn 細胞では FIR アデノウイルスペクターの感染効率が低い(タンパク質発現量が低い)にも関わらず、殺細胞効果は高かった。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書に組み入れるものとする。

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、c-myc 遺伝子を標的として、細胞アポトーシスを安定かつ確実に有効するための新しい手段が提供される。これによって癌治療に新たな途が拓かれる。

## 請求の範囲

1. FUSE 結合タンパク質 (FUSE binding protein) と相互作用するタンパク質を有効成分として含有するアポトーシス誘導剤。
2. FUSE 結合タンパク質と相互作用するタンパク質が、配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質；配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が消失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつアポトーシス誘導活性を有するタンパク質；又はそれらの部分ペプチドである、請求項 1 に記載のアポトーシス誘導剤。
3. FUSE 結合タンパク質と相互作用するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを有効成分として含有するアポトーシス誘導剤。
4. FUSE 結合タンパク質と相互作用するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；配列表の配列番号 1 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつアポトーシス誘導活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；又は、それらの部分断片である、請求項 3 に記載のアポトーシス誘導剤。
5. 細胞内に導入可能な形態を有していることを特徴とする、請求項 1～4 のいずれかに記載のアポトーシス誘導剤。
6. 細胞内に導入可能な形態がベクターである、請求項 5 に記載のアポトーシス誘導剤。
7. 癌の治療のために用いる、請求項 1～6 のいずれかに記載のアポトーシス誘導剤。
8. c-myc 遺伝子発現により増殖する細胞にアポトーシスを誘導する方法であって、請求項 1～7 のいずれかに記載のアポトーシス誘導剤を細胞に接触させる工程を含むことを特徴とするアポトーシス誘導方法。
9. 細胞が癌細胞である請求項 8 の方法。

1 0 . 細胞が哺乳動物の体内にある細胞である請求項 8 又は 9 に記載の方法。

1 1 . 哺乳動物がヒトである請求項 1 0 に記載の方法。

1 2 . 哺乳動物に対して、配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質；配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつアポトーシス誘導活性を有するタンパク質；又はそれらの部分ペプチドの有効量を投与することを特徴とする、癌の治療方法。

1 3 . 哺乳動物に対して、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；配列表の配列番号 1 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつアポトーシス誘導活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；又はそれらの断片の有効量を投与することを特徴とする、癌の治疗方法。

1 4 . 哺乳動物がヒトである請求項 1 2 又は 1 3 に記載の方法。

図 1

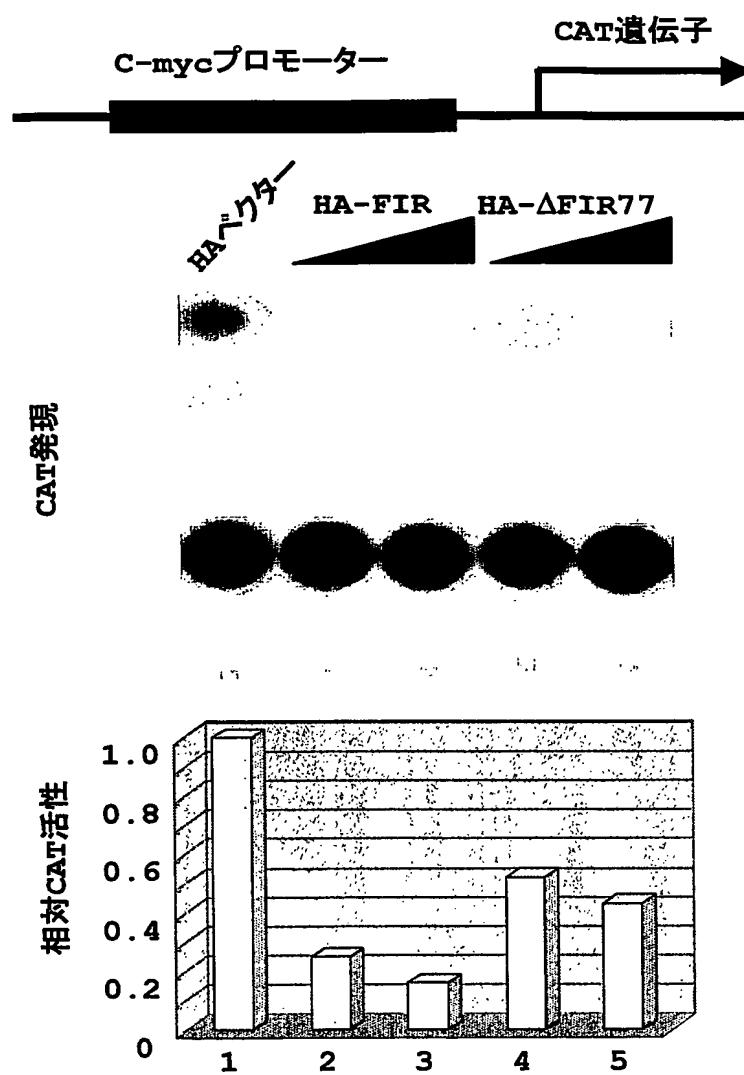


图 2

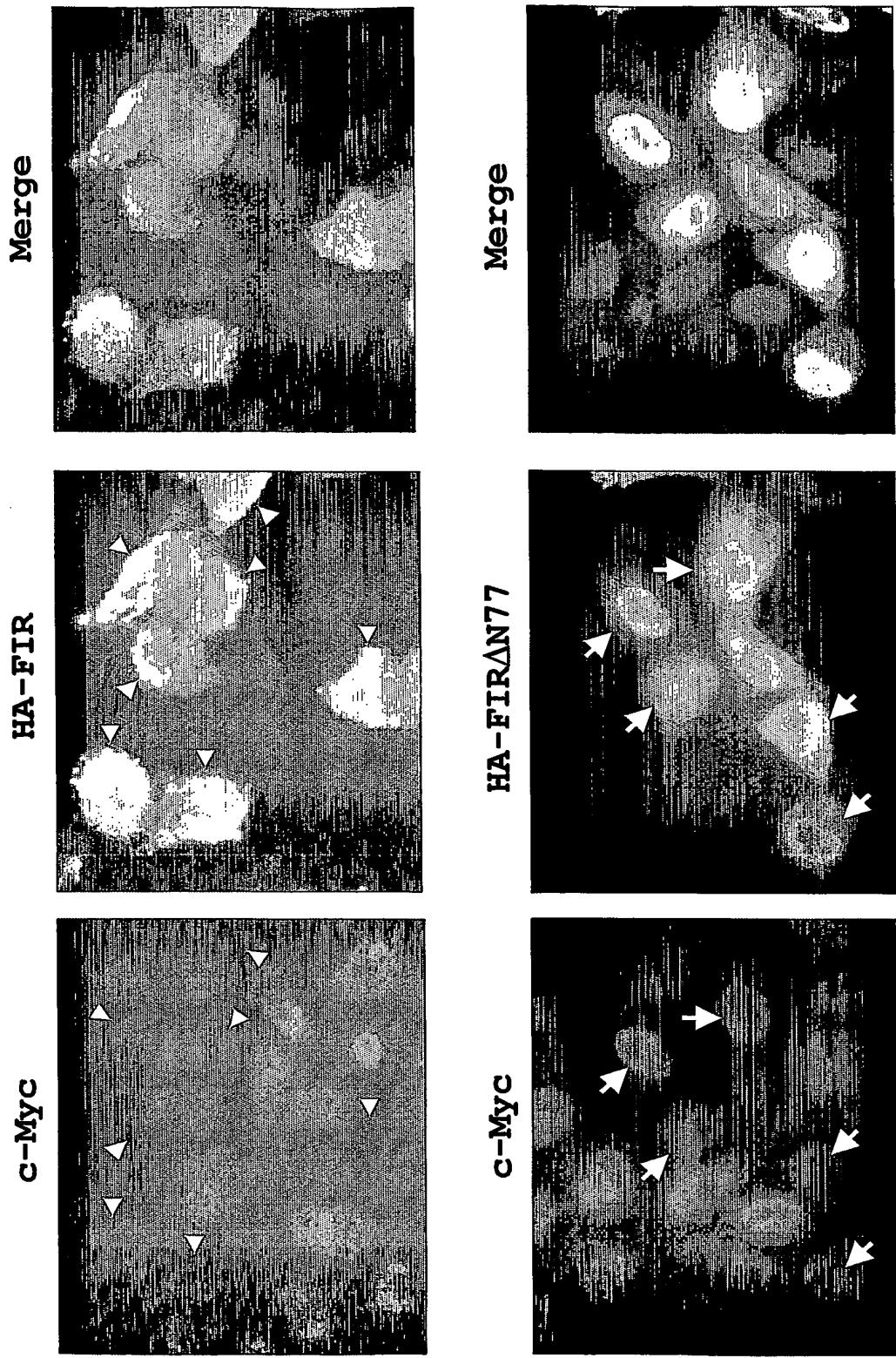


図3

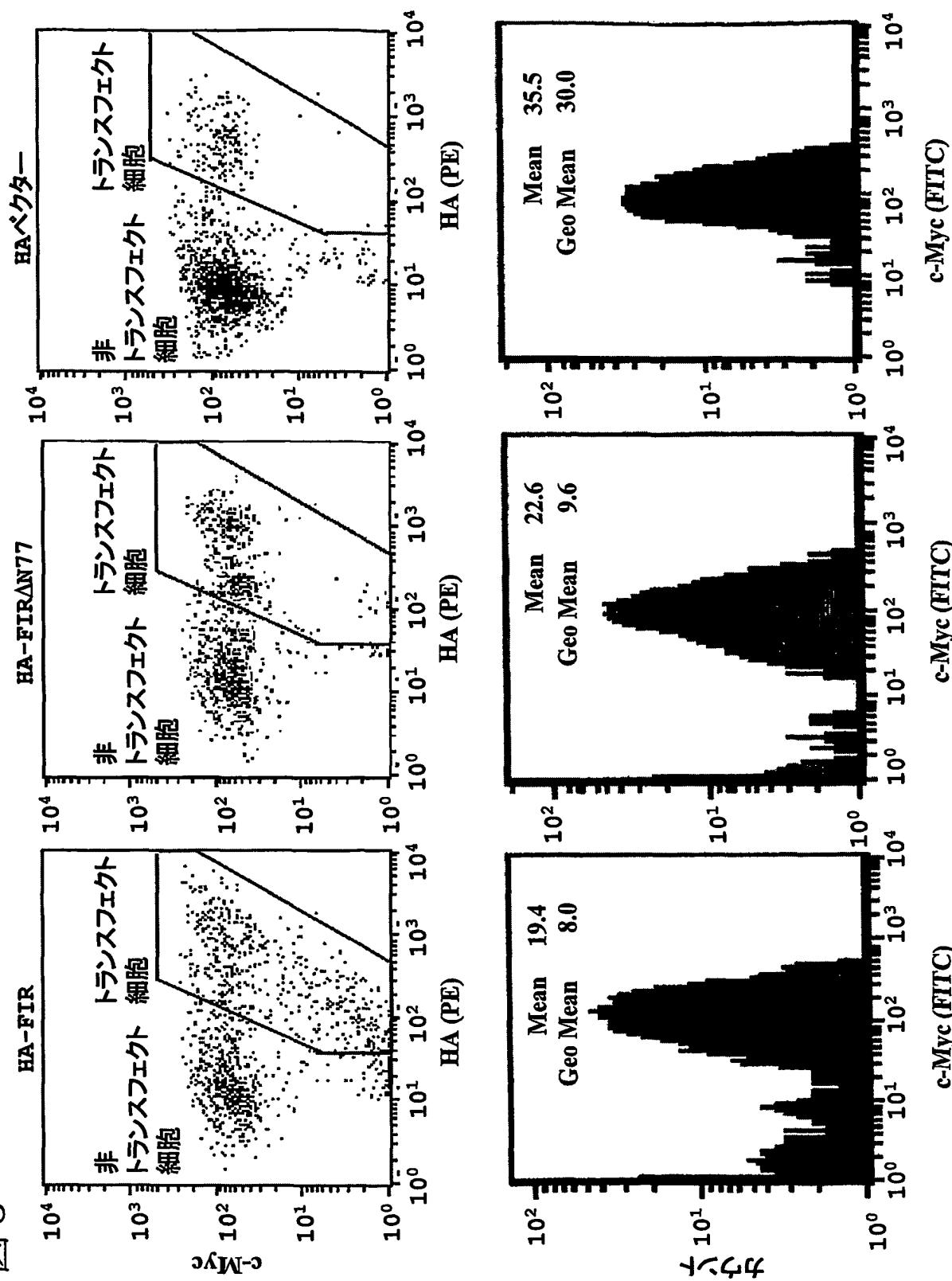


図 4

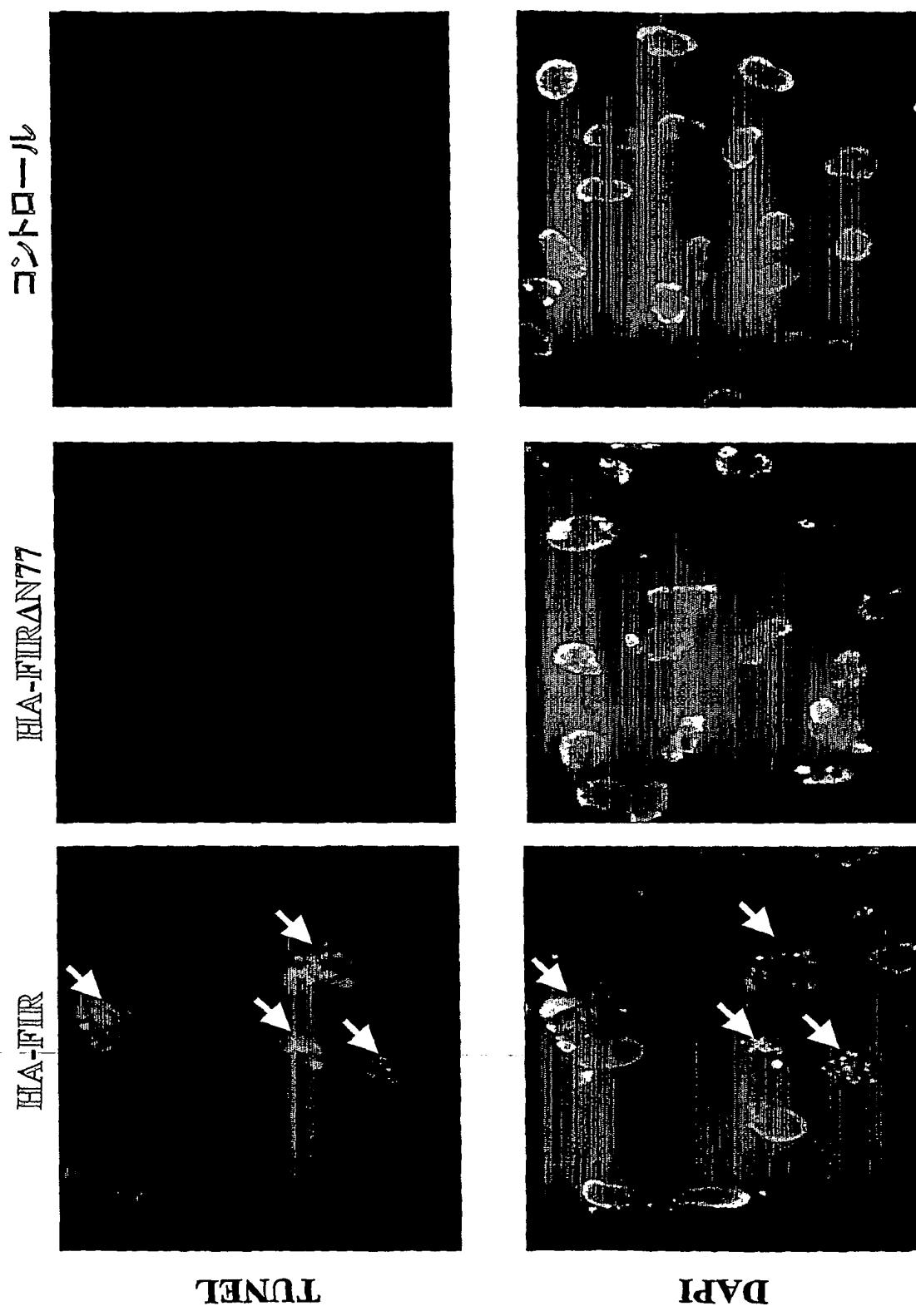
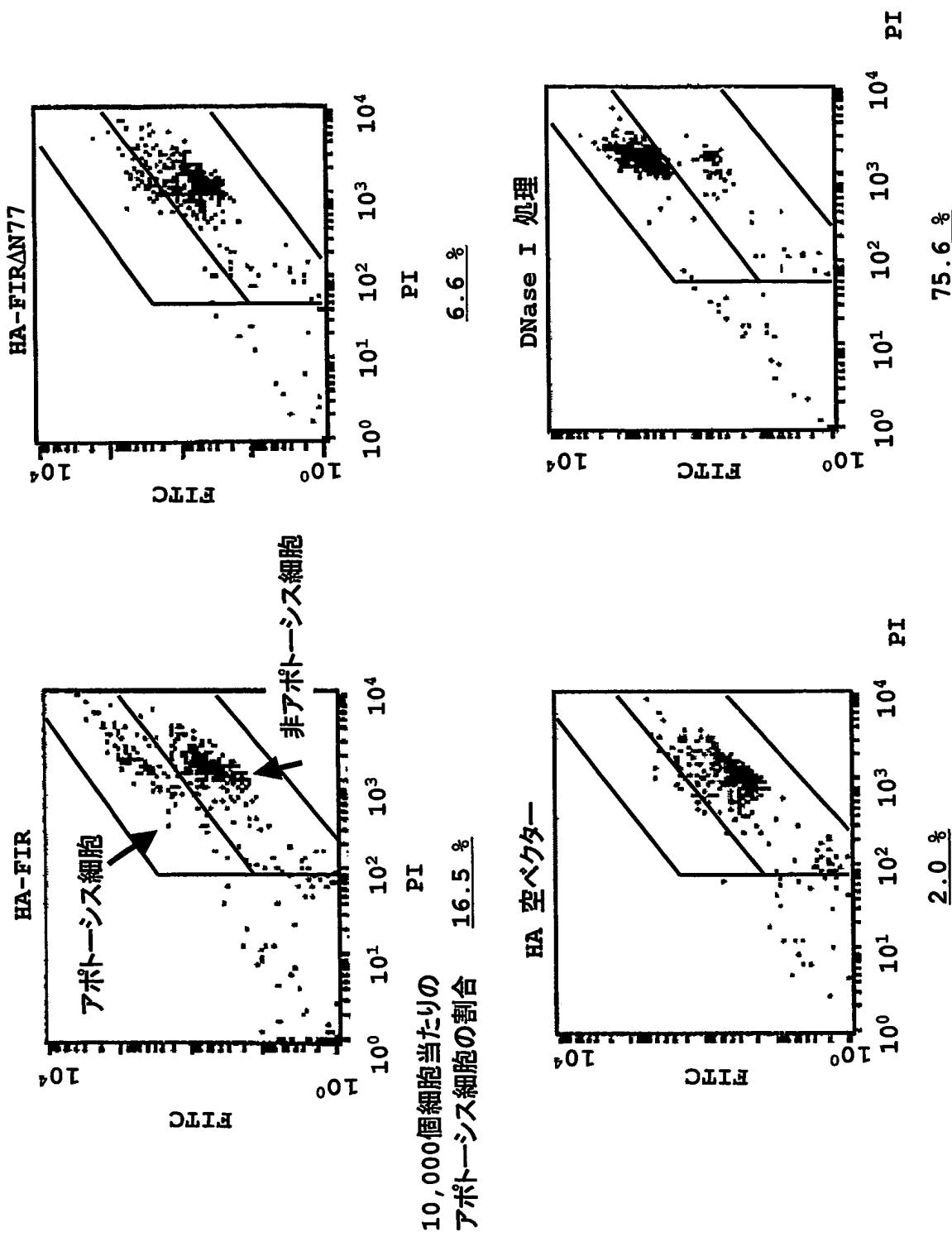


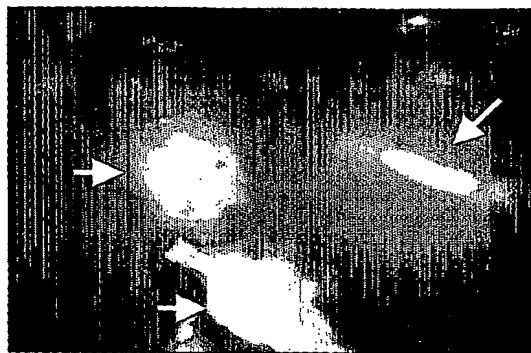
図 5



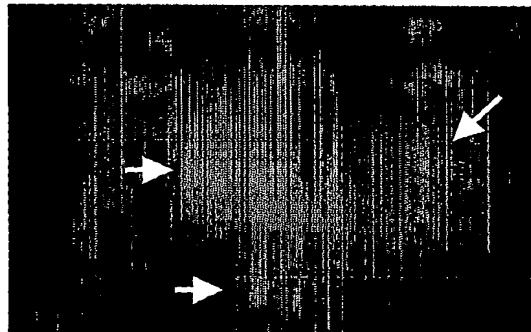
☒ 6

**FIR**  
c-Myc+  
-

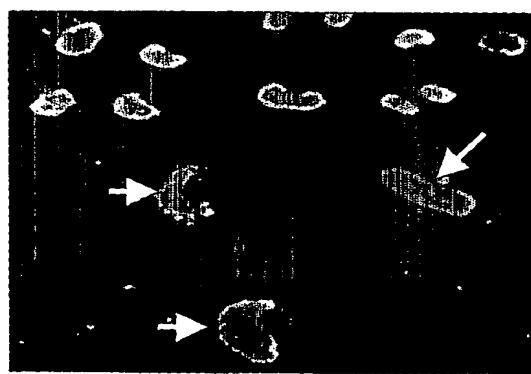
FIR



c-Myc



DAPI



+

+

+

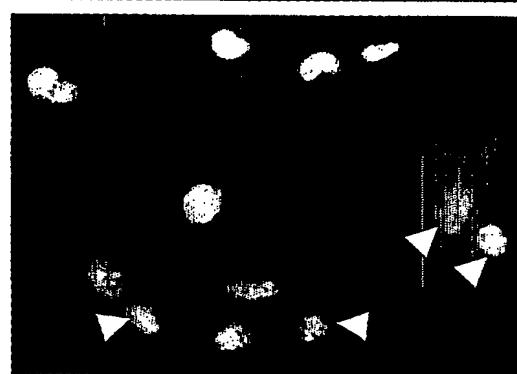
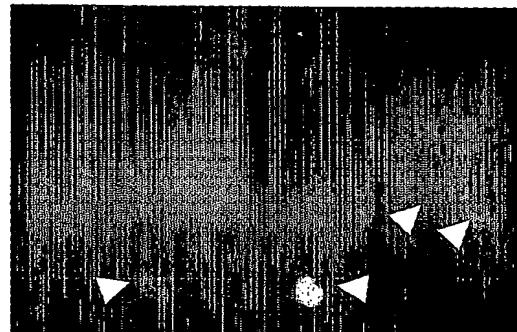
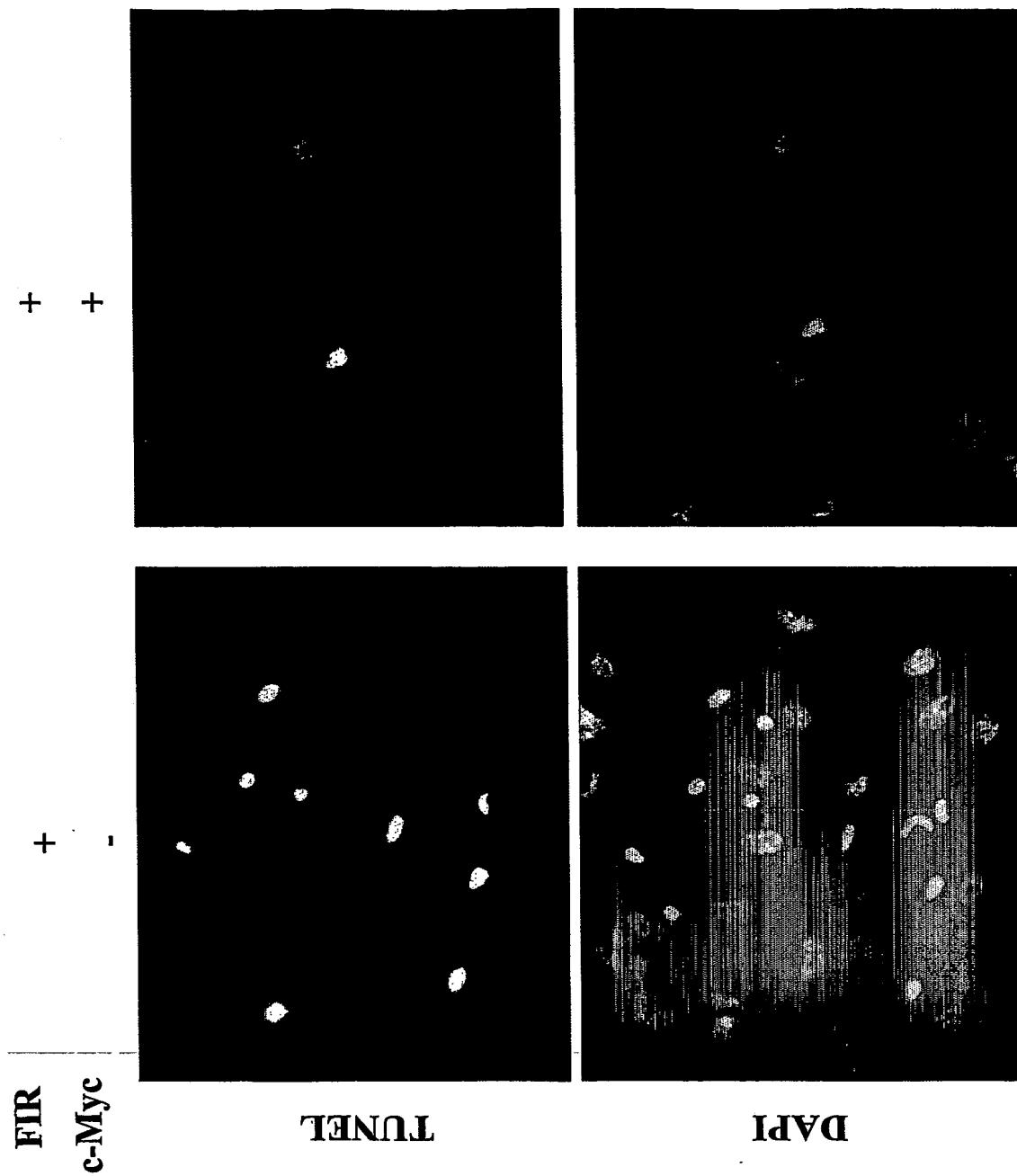


図 7



4.2%

88

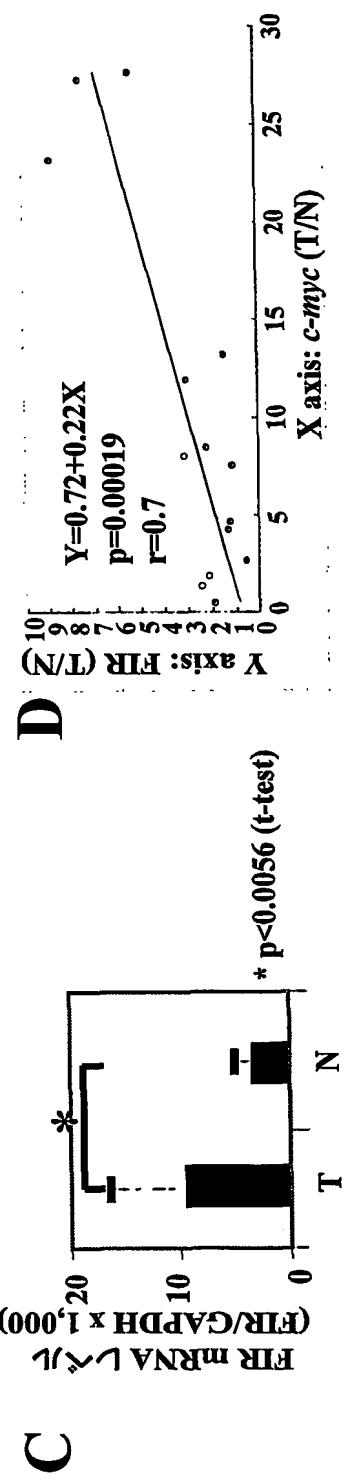
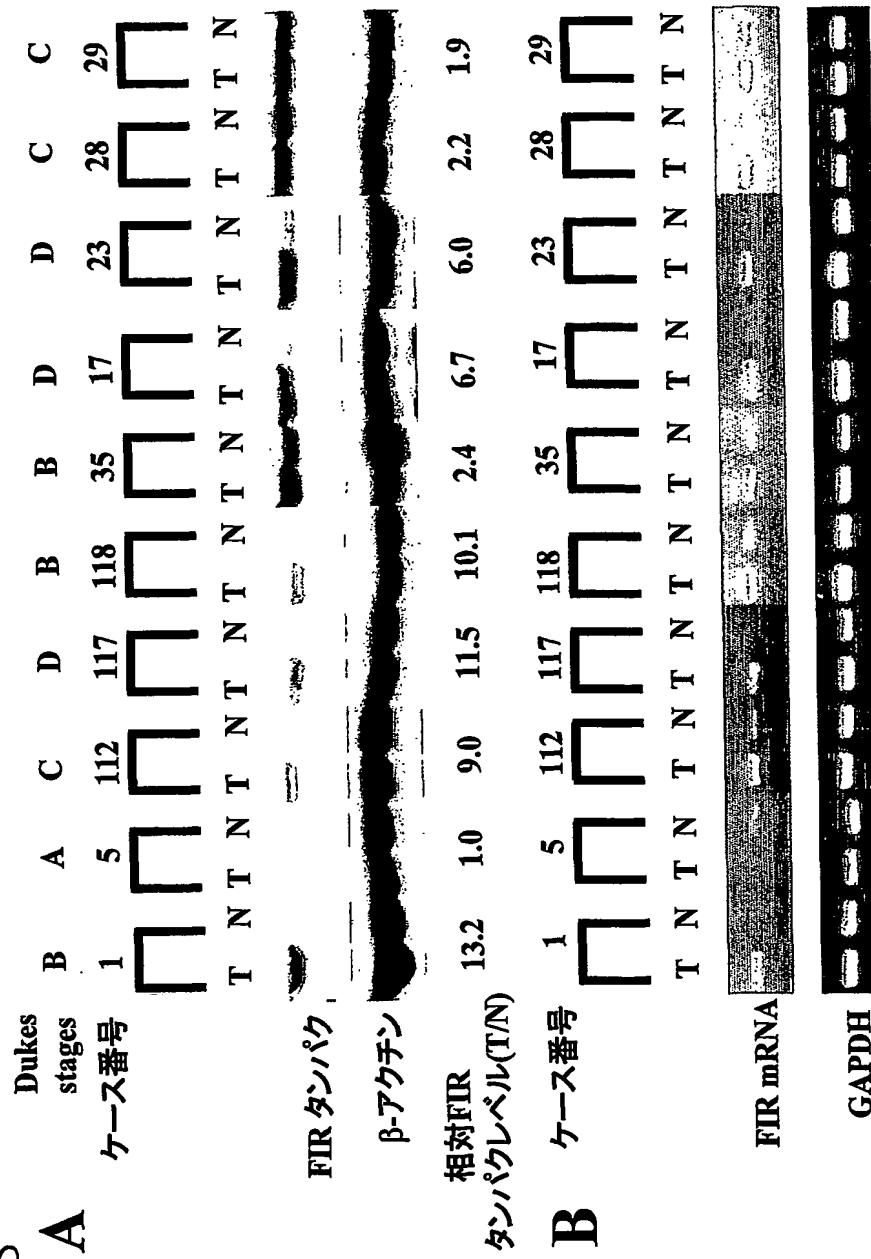


図9

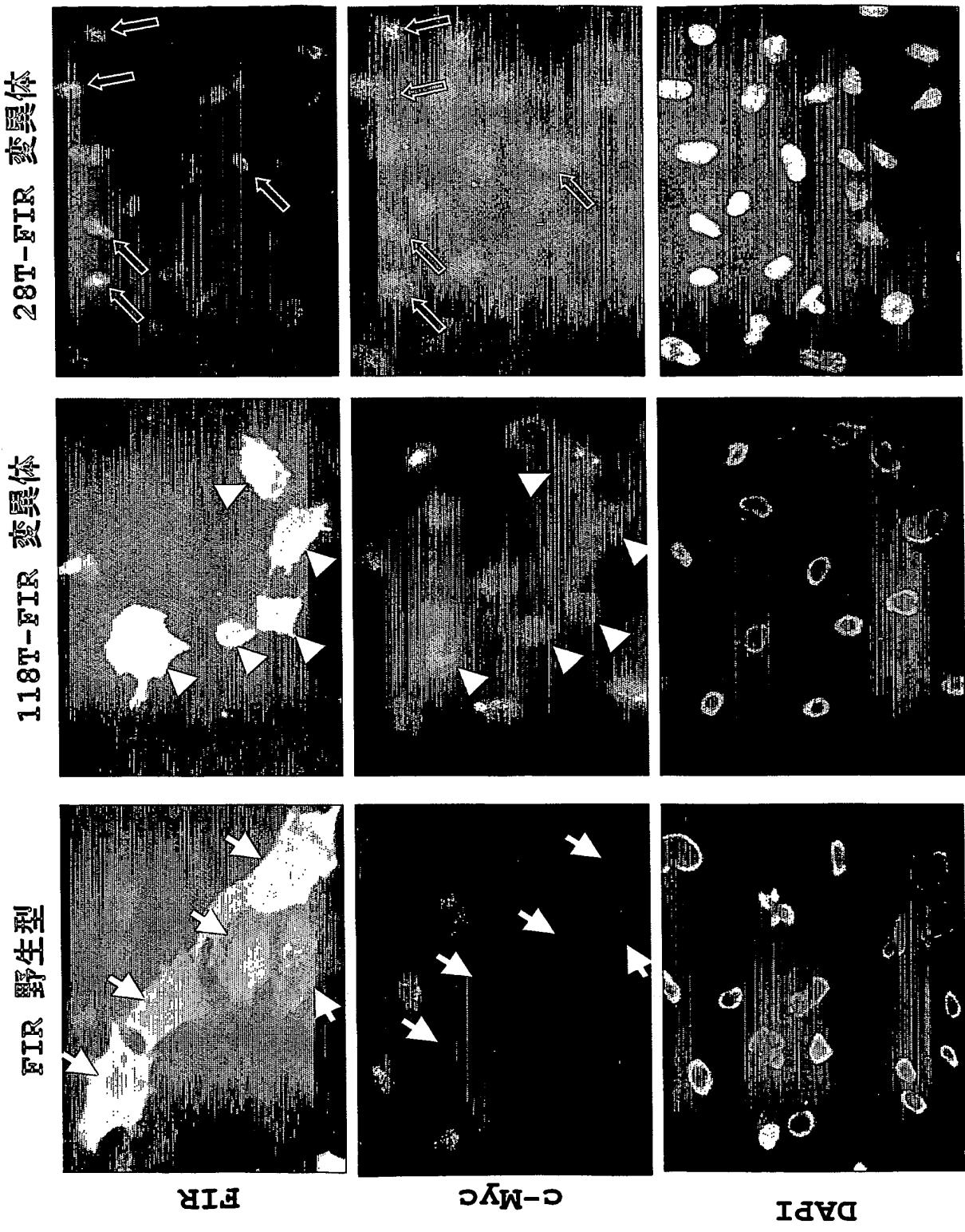


図 10

FIR 野生型 118T-FIR 変異体 28T-FIR 変異体

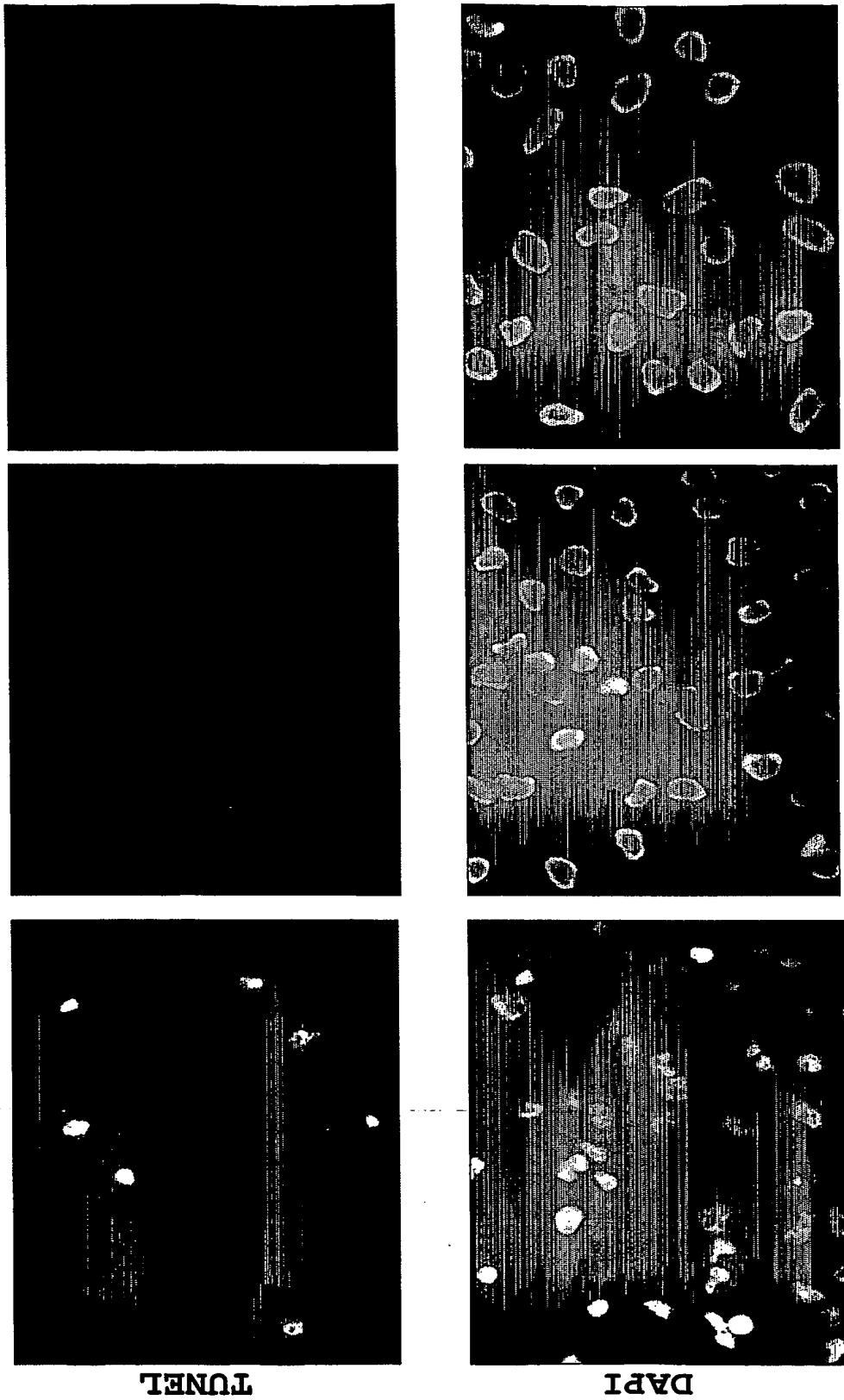


図 1 1

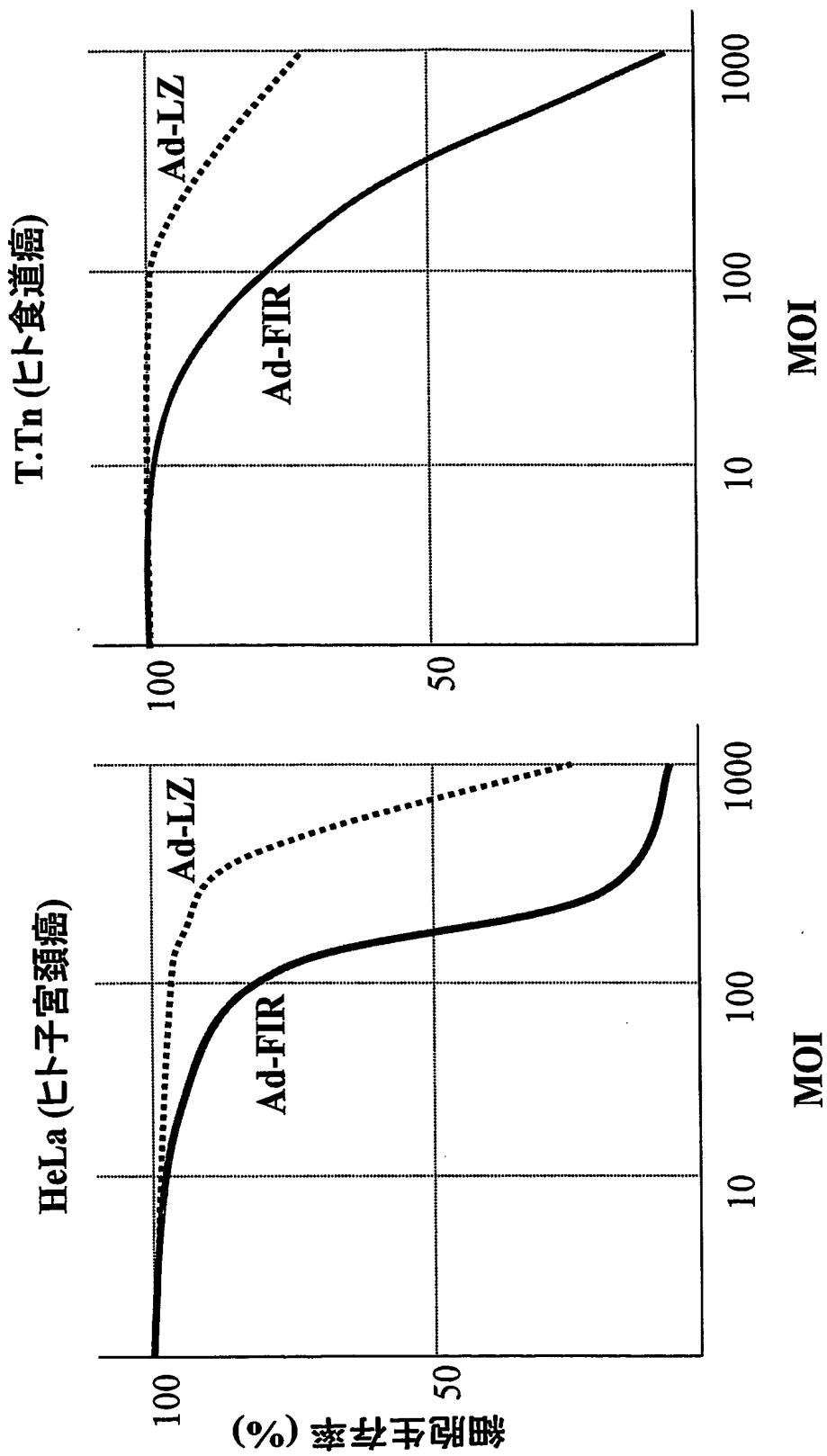
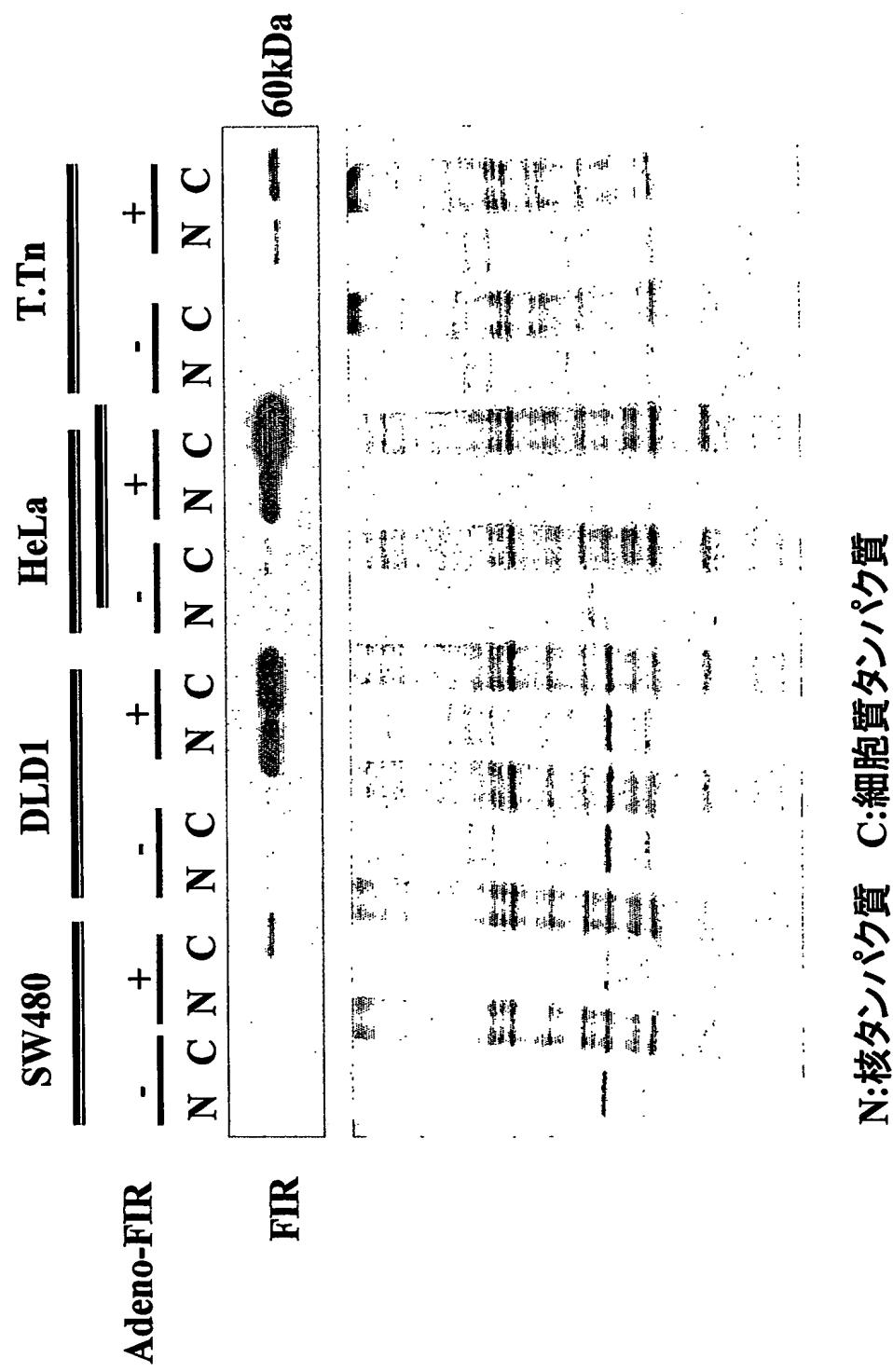


図 1 2



## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> An apoptosis inducing agent and a method for inducing apoptosis

<130> PH-2082-PCT

<150> JP 2003-116299

<151> 2003-04-21

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1853

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (65)..(1693)

<300>

<301> Liu, J. et al.

<302> Defective interplay of activators with TFIH in xeroderma  
pigmentosum

<303> Cell

<304> 104

<305> 3

<306> 353-353

<307> 2001

<308> GenBank/NM\_14281

<309> 2001-12-26

<313> 1 TO 1853

<400> 1

atcgcgcgag acagcggaaag gagcaagagt gggaggcgcg cgccggaggcc gcgacggacg 60

caag atg gcg acg gcg acc ata gct ctc cag gtc aat ggc cag caa gga 109

Met Ala Thr Ala Thr Ile Ala Leu Gln Val Asn Gly Gln Gln Gly

1

5

10

15

ggg ggg tcc gag ccg gcg gcg gca gtg gtg gca gcg gga gac 157

Gly Gly Ser Glu Pro Ala Ala Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Asp

20

25

30

aaa tgg aaa cct cca cag ggc aca gac tcc atc aag atg gag aac ggg 205

Lys Trp Lys Pro Pro Gln Gly Thr Asp Ser Ile Lys Met Glu Asn Gly

35

40

45

cag agc aca gcc gcc aag ctg ggg ctg cct ccc ctg acg ccc gag cag 253

Gln Ser Thr Ala Ala Lys Leu Gly Leu Pro Pro Leu Thr Pro Glu Gln

50

55

60

cag gag gcc ctt cag aag gcc aag aag tac gcc atg gag cag agc atc 301

Gln Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Lys Tyr Ala Met Glu Gln Ser Ile

65

70

75

aag agt gtg ctg gtg aag cag acc atc gcg cac cag cag cag ctc 349

Lys Ser Val Leu Val Lys Gln Thr Ile Ala His Gln Gln Gln Leu

80 85 90 95

acc aac ctg cag atg gcg gct cag cgg cag cgg gcg ctg gcc atc atg 397  
Thr Asn Leu Gln Met Ala Ala Gln Arg Gln Arg Ala Leu Ala Ile Met  
100 105 110

tgc cgc gtc tac gtg ggc tct atc tac tat gag ctg ggg gag gac acc 445  
Cys Arg Val Tyr Val Gly Ser Ile Tyr Tyr Glu Leu Gly Glu Asp Thr  
115 120 125

atc cgc cag gcc ttt gcc ccc ttt ggc ccc atc aag agc atc gac atg 493  
Ile Arg Gln Ala Phe Ala Pro Phe Gly Pro Ile Lys Ser Ile Asp Met  
130 135 140

tcc tgg gac tcc gtc acc atg aag cac aag ggc ttt gcc ttc gtg gag 541  
Ser Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly Phe Ala Phe Val Glu  
145 150 155

tat gag gtc ccc gaa gct gca cag ctg gcc ttg gag cag atg aac tcg 589  
Tyr Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu Glu Gln Met Asn Ser  
160 165 170 175

gtg atg ctg ggg ggc agg aac atc aag gtg ggc aga ccc agc aac ata 637  
Val Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly Arg Pro Ser Asn Ile  
180 185 190

ggg cag gcc cag ccc atc ata gac cag ttg gct gag gag gca cgg gcc 685  
Gly Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala Glu Glu Ala Arg Ala  
195 200 205

ttc aac cgc atc tac gtg gcc tct gtg cac cag gac ctc tca gac gat 733  
Phe Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln Asp Leu Ser Asp Asp

210 215 220

gac atc aag agc gtg ttt gag gcc ttt ggc aag atc aag tcc tgc aca 781  
Asp Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys Ile Lys Ser Cys Thr

225 230 235

ctg gcc cgg gac ccc aca act ggc aag cac aag ggc tac ggc ttc att 829  
Leu Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys Gly Tyr Gly Phe Ile  
240 245 250 255

gag tac gag aag gcc cag tcg tcc caa gat gct gtg tct tcc atg aac 877  
Glu Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala Val Ser Ser Met Asn  
260 265 270

ctc ttt gac ctg ggt ggc cag tac ttg cgg gtg ggc aag gct gtc aca 925  
Leu Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val Gly Lys Ala Val Thr  
275 280 285

ccg ccc atg ccc cta ctc aca cca gcc acg cct gga ggc ctc cca cct 973  
Pro Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Gly Gly Leu Pro Pro  
290 295 300

gcc gct gct gtg gca gct gca gcc act gcc aag atc aca gct cag 1021  
Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Thr Ala Lys Ile Thr Ala Gln  
305 310 315

gaa gca gtg gcc gga gca gcg gtg ctg ggt acc ctg ggc aca cct gga 1069

Glu Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr Leu Gly Thr Pro Gly

320 325 330 335

ctg gtg tcc cca gca ctg acc ctg gcc cag ccc ctg ggc act ttg ccc 1117

Leu Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro Leu Gly Thr Leu Pro

340 345 350

cag gct gtc atg gct gcc cag gca cct gga gtc atc aca ggt gtg acc 1165

Gln Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val Ile Thr Gly Val Thr

355 360 365

cca gcc cgt cct cct atc ccg gtc acc atc ccc tcg gtg gga gtg gtg 1213

Pro Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro Ser Val Gly Val Val

370 375 380

aac ccc atc ctg gcc agc cct cca acg ctg ggt ctc ctg gag ccc aag 1261

Asn Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly Leu Leu Glu Pro Lys

385 390 395

aag gag aag gaa gaa gag gag ctg ttt ccc gag tca gag cgg cca gag 1309

Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu Ser Glu Arg Pro Glu

400 405 410 415

atg ctg agc gag cag gag cac atg agc atc tcg ggc agt agc gcc cga 1357

Met Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser Gly Ser Ser Ala Arg

420 425 430

cac atg gtg atg cag aag ctg ctc cgc aag cag gag tct aca gtg atg 1405

His Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln Glu Ser Thr Val Met

435 440 445

gtt ctg cgc aac atg gtg gac ccc aag gac atc gat gat gac ctg gaa 1453

Val Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile Asp Asp Asp Leu Glu

450 455 460

ggg gag gtg aca gag gag tgt ggc aag ttc ggg gcc gtg aac cgc gtc 1501

Gly Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly Ala Val Asn Arg Val

465 470 475

atc atc tac caa gag aaa caa ggc gag gag gag gat gca gaa atc att 1549

Ile Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Glu Asp Ala Glu Ile Ile

480 485 490 495

gtc aag atc ttt gtg gag ttt tcc ata gcc tct gag act cat aag gcc 1597

Val Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser Glu Thr His Lys Ala

500 505 510

atc cag gcc ctc aat ggc cgc tgg ttt gct ggc cgc aag gtg gtg gct 1645

Ile Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly Arg Lys Val Val Ala

515 520 525

gaa gtg tac gac cag gag cgt ttt gat aac agt gac ctc tct gcg tga 1693

Glu Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser Asp Leu Ser Ala

530 535 540

cagtggtccc tctccccgga ctgcacttg ttcccttgtt cctctgggtt ttagatgtat 1753

acagtggtgt ccccgcccc aggccgcgtc tgcccagccc agcctacagt gcggataaag 1813

gtgcggatgc tgctggccct gaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa 1853

<210> 2

<211> 542

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Thr Ala Thr Ile Ala Leu Gln Val Asn Gly Gln Gln Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Glu Pro Ala Ala Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Asp Lys

20 25 30

Trp Lys Pro Pro Gln Gly Thr Asp Ser Ile Lys Met Glu Asn Gly Gln

35 40 45

Ser Thr Ala Ala Lys Leu Gly Leu Pro Pro Leu Thr Pro Glu Gln Gln

50 55 60

Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Lys Tyr Ala Met Glu Gln Ser Ile Lys

65 70 75 80

Ser Val Leu Val Lys Gln Thr Ile Ala His Gln Gln Gln Leu Thr

85 90 95

Asn Leu Gln Met Ala Ala Gln Arg Gln Arg Ala Leu Ala Ile Met Cys

100 105 110

Arg Val Tyr Val Gly Ser Ile Tyr Tyr Glu Leu Gly Glu Asp Thr Ile

115 120 125

Arg Gln Ala Phe Ala Pro Phe Gly Pro Ile Lys Ser Ile Asp Met Ser

130 135 140

Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly Phe Ala Phe Val Glu Tyr  
145 150 155 160  
Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu Glu Gln Met Asn Ser Val  
165 170 175  
Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly Arg Pro Ser Asn Ile Gly  
180 185 190  
Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala Glu Glu Ala Arg Ala Phe  
195 200 205  
Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln Asp Leu Ser Asp Asp Asp  
210 215 220  
Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys Ile Lys Ser Cys Thr Leu  
225 230 235 240  
Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys Gly Tyr Gly Phe Ile Glu  
245 250 255  
Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala Val Ser Ser Met Asn Leu  
260 265 270  
Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val Gly Lys Ala Val Thr Pro  
275 280 285  
Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Gly Gly Leu Pro Pro Ala  
290 295 300  
Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Thr Ala Lys Ile Thr Ala Gln Glu  
305 310 315 320  
Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr Leu Gly Thr Pro Gly Leu  
325 330 335  
Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro Leu Gly Thr Leu Pro Gln  
340 345 350  
Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val Ile Thr Gly Val Thr Pro  
355 360 365  
Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro Ser Val Gly Val Val Asn

370                    375                    380  
Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly Leu Leu Glu Pro Lys Lys  
385                    390                    395                    400  
Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu Ser Glu Arg Pro Glu Met  
405                    410                    415  
Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser Gly Ser Ser Ala Arg His  
420                    425                    430  
Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln Glu Ser Thr Val Met Val  
435                    440                    445  
Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile Asp Asp Asp Leu Glu Gly  
450                    455                    460  
Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly Ala Val Asn Arg Val Ile  
465                    470                    475                    480  
Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Asp Ala Glu Ile Ile Val  
485                    490                    495  
Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser Glu Thr His Lys Ala Ile  
500                    505                    510  
Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly Arg Lys Val Val Ala Glu  
515                    520                    525  
Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser Asp Leu Ser Ala  
530                    535                    540

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 3

ggccccatca agagcatg

18

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 4

ggggctgggc cagggtcag

19

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 5

gcacctggag tcatcaca

18

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6

cgcagaacca tcacitgtag

19

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7

ggagtctaca gtgatggttc

20

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8

tcctggtcgt acacttca

18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9

gcctcagagt gcatcgac

18

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 10

tccacagaaaa caacatcg

18

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 11

tggagaaaaat ctggcaccac

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 12

aatgggtatg acctggccgt

20

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 13

agacagcgga aggagcaaga gtgg

24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 14

ctgtgcagct tcggggacct cata

24

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004516

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/17, 48/00, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/17, 48/00, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE CAPLUS EMBASE BIOSIS CANCERLIT (STN) JSTPLUS JMEDPLUS (JOIS)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 2004/018679 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 04 March, 2004 (04.03.04), Page 205, line 22 to page 211, line 2 (Family: none)	1-7
P,Y	WO 2004/027061 A1 (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), 01 April, 2004 (01.04.04), Page 2, 2nd line from the bottom to last line (Family: none)	1-7
A	Liu J. et al., "The FBP interacting repressor targets TFIIH to inhibit activated transcription.", Mol Cell. 2000 February; 5(2): 331-41	1-7

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
03 June, 2004 (03.06.04)Date of mailing of the international search report  
22 June, 2004 (22.06.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004516

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Liu J. et al., "Defective interplay of activators and repressors with TFIH in xeroderma pigmentosum.", Cell., 09 February, 2001 (09.02.01); 104(3): 353-63.	1-7
A	He L. et al., "Loss of FBP function arrests cellular proliferation and extinguishes c-myc expression.", EMBO J., 01 March, 2000 (01.03.00); 19(5): 1034-44.	1-7
P,X	Kazuyuki MATSUSHITA et al., "c-myc Idenshi Tensha Yokusei Inshi ni yoru Apoptosis Yudo Mechanism ni Tsuite", The Japanese Cancer Association Sokai Kiji, 25 August, 2003 (25.08.03), Vol.62nd; page 126 (ISSN: 0546-0476)	1-7

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/004516

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
  - a. type of material
    - a sequence listing
    - table(s) related to the sequence listing
  - b. format of material
    - in written format
    - in computer readable form
  - c. time of filing/furnishing
    - contained in the international application as filed
    - filed together with the international application in computer readable form
    - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/004516

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 8-14

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 8 to 14 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/004516

**<Subject of search>**

Claims 1, 3 and 5 to 7 relate to an apoptosis inducing agent containing, as the active ingredient, a protein defined by a desired property as "a protein interacting with a FUSE binding protein". Thus, claims 1, 3 and 5 to 7 involve any proteins having such a property in the scopes thereof. However, it is recognized that only small part of the claimed proteins are exclusively disclosed in the description in the meaning within PCT Article 5 and thus these claims are not supported by the disclosure in the description in the meaning within PCT Article 6.

Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it cannot be recognized that the scope of proteins having the above property as "a protein interacting with a FUSE binding protein" could be specified. Thus, claims 1, 3 and 5 to 7 do not comply with the requirement of clearness as defined in PCT Article 6 too.

Therefore, the search was made on an apoptosis inducing agent containing as the active ingredient FIR (Fuse binding protein Interacting Repressor) which is specified in claims 2 and 4. Claims 2 and 4 were completely searched.

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. C17 A61K38/17, 48/00, A61P35/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. C17 A61K38/17, 48/00, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

MEDLINE CAPLUS EMBASE BIOSIS CANCERLIT (STN) JSTPLUS JMEDPLUS (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO 2004/018679 A1 (科学技術振興事業団) 2004. 03. 04, 第205頁22行-第211頁2行 (ファミリーなし)	1-7
P, Y	WO 2004/027061 A1 (山之内製薬株式会社) 2004. 04. 01, 第2頁下から2行-末行 (ファミリーなし)	1-7
A	Liu J et al. 'The FBP interacting repressor targets TFIID to inhibit activated transcription.', Mol Cell. 2000 Feb; 5(2): 331-41	1-7

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

03. 06. 2004

## 国際調査報告の発送日

22. 6. 2004

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官（権限のある職員）

川口 裕美子

4C 9829

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	Liu J et al. 'Defective interplay of activators and repressors with TFIH in xeroderma pigmentosum.' Cell. 2001 Feb 9;104(3):353-63.	1 - 7
A	He L et al. 'Loss of FBP function arrests cellular proliferation and extinguishes c-myc expression.', EMBO J. 2000 Mar 1;19(5):1034-44.	1 - 7
P, X	松下一之ら、「c-myc遺伝子転写抑制因子によるアポトーシス誘導メカニズムについて」, 日本癌学会総会記事, 2003. 08. 25, VOL. 62nd ; PAGE. 126 (ISSN: 0546-0476)	1 - 7

## 第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. bの続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ  配列表  
 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット  書面  
 コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期  出願時の国際出願に含まれる  
 この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された  
 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2.  さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 8-14 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 8-14 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## &lt;調査の対象について&gt;

請求の範囲1,3,5-7は、「FUSE結合タンパク質(FUSE binding protein)と相互作用するタンパク質」という所望の性質により定義されたタンパク質を有効成分とするアポトーシス誘導剤に関するものである。そして、請求の範囲1,3,5-7は、そのような性質を有するあらゆるタンパク質を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは、クレームされたタンパク質のごくわずかな部分にすぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「FUSE結合タンパク質(FUSE binding protein)と相互作用するタンパク質」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有するタンパク質の範囲を特定できないから、請求の範囲1,3,5-7は、PCT第6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、明細書に具体的に記載され、請求の範囲2,4に特定されている FIR (Fuse binding protein Interacting Repressor) を有効成分とするアポトーシス誘導剤について行った。また、請求の範囲2,4については、完全な調査を行った。